

NORME
INTERNATIONALE

ISO
10519

Première édition
1992-08-15

**Graines de colza — Détermination de la teneur
en chlorophylle — Méthode spectrométrique**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Rapeseed — Determination of chlorophyll content — Spectrometric
method*
(standards.iteh.ai)

ISO 10519:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f4ad0-7a34-4743-993e-4baadc7b8a36/iso-10519-1992>



Numéro de référence
ISO 10519:1992(F)

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CÉI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 10519 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 2, *Graines et fruits oléagineux*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f4ad0-7a34-4743-993e-4baadc7b8a36/iso-10519-1992>

Les annexes A, B et C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1992

Droits de reproduction réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Graines de colza — Détermination de la teneur en chlorophylle — Méthode spectrométrique

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode spectrométrique de détermination de la teneur en chlorophylle des graines de colza. Elle ne s'applique pas à la détermination de la chlorophylle dans les huiles.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 648:1977, *Verrerie de laboratoire — Pipettes à un trait*.

ISO 664:1990, *Graines oléagineuses — Réduction de l'échantillon pour laboratoire en échantillon pour essai*.

ISO 665:1977, *Graines oléagineuses — Détermination de la teneur en eau et matières volatiles*.

3 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

3.1 teneur en chlorophylle: Fraction en masse des substances dans l'échantillon participant à l'absorption dans la bande voisine de 665 nm, déterminée dans les conditions opératoires de la présente

Norme internationale, mesurée comme chlorophylle A. La teneur en chlorophylle, mesurée en chlorophylle A, est exprimée en milligrammes par kilogramme.

4 Principe

Extraction d'une prise d'essai dans un appareil adapté, avec une solution d'éthanol et d'iso-octane, ou encore de propane-2-ol, de méthanol et d'iso-octane. Détermination spectrométrique de la teneur en chlorophylle de l'extrait en solution.

5 Réactifs

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Solvant d'extraction, préparé comme suit.

Dans un bécher de 500 ml, introduire

- 100 ml d'éthanol anhydre, ou
- 50 ml de propane-2-ol anhydre et 50 ml de méthanol anhydre.

Ajouter au contenu du bécher, 300 ml d'iso-octane (triméthyl-2,2,5-pentane) ou de *n*-heptane ou d'éther de pétrole (composé essentiellement d'hydrocarbures en C₇, ayant un intervalle d'ébullition compris entre 90 °C et 100 °C).

6 Appareillage

Appareillage courant de laboratoire, et notamment

6.1 Balance analytique, précise à 1 mg près.

6.2 Moulin mécanique, du type moulin à couteaux, moulin à café ou équivalent.

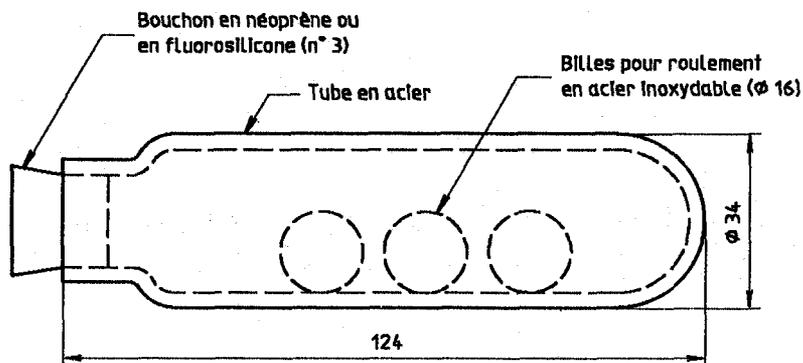


Figure 1 — Micro-broyeur mécanique

6.3 Micro-broyeur mécanique (voir figure 1), composé de tubes en acier inoxydable, d'un volume de 50 ml environ, pouvant être bouchés solidement, de billes pour roulements en acier inoxydable (\varnothing 16 mm) et d'un système permettant d'agiter horizontalement les tubes bouchés à une fréquence de 240 min^{-1} , avec un déplacement latéral de 3,5 cm, ou **broyeur à billes de Dangoumau**.¹⁾

6.4 Papier filtre, vitesse moyenne, plié en V.

6.5 Spectromètre, permettant d'effectuer les mesurages d'absorbance entre 600 nm et 700 nm avec une largeur de bande spectrale de 2 nm.

Si le spectromètre ne permet pas d'obtenir une largeur de bande de 2 nm, il convient de procéder à un étalonnage à la chlorophylle A pure, comme décrit dans l'annexe B.

6.6 Cuves, ayant un parcours optique au moins égal à 10 mm.

6.7 Pipettes, de 30 ml, conformes aux prescriptions de l'ISO 648, classe A, ou **dispositif automatique** permettant de délivrer des quantités de 30 ml avec une erreur inférieure à 1 %.

6.8 Tubes de culture, de 20 ml, munis de bouchons.

7 Échantillonnage

Il est essentiel que l'échantillon réceptionné par le laboratoire soit réellement représentatif et non endommagé ou modifié durant le transport et l'entreposage.

1) Le broyeur à billes de Dangoumau est un exemple d'appareil approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif de l'appareil ainsi désigné.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 542.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer un échantillon pour essai conformément à l'ISO 664, à partir de l'échantillon pour laboratoire tel qu'il est reçu ou après séparation des impuretés.

Sécher les graines ayant une humidité supérieure à 10 % (m/m) pendant 12 h à 45 °C afin de réduire la teneur en eau à 10 % (m/m) ou moins, sans décomposer les pigments de chlorophylle.

Transférer 50 g de l'échantillon pour essai dans le moulin mécanique (6.2) et mouline les graines jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Si l'on utilise un moulin de petites dimensions, par exemple un moulin à café, mouline plusieurs quantités élémentaires de 10 g puis les mélanger soigneusement.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai

Peser, à 1 mg près, 4 g de l'échantillon pour essai (article 8) dans un tube en acier inoxydable ou dans le réceptacle du broyeur de Dangoumau (6.3).

9.2 Extraction

9.2.1 Ajouter, à la pipette (6.7), 30 ml du solvant d'extraction (5.1) dans le tube ou le réceptacle.

Si l'on utilise un tube, introduire trois billes en acier

inoxydable et agiter pendant 1 h. Pour le broyeur de Dangoumau, introduire des billes en acier (au moins quatre de taille moyenne) dans le réceptacle et procéder à l'extraction pendant 20 min.

9.2.2 Laisser reposer l'extrait pendant 10 min, puis décanter au travers du papier filtre (6.4), dans un tube de culture (6.8), un volume suffisant du filtrat pour remplir la cuve du spectromètre (6.6). Boucher le tube aussitôt que possible afin de réduire l'évaporation au minimum.

NOTE 1 La présence de plus d'une phase dans le solvant d'extraction indique la présence d'une humidité excessive, soit dans l'échantillon [qui devrait contenir moins de 10 % (m/m) d'humidité], soit dans les solvants (qui devraient être anhydres).

9.3 Détermination

Verser le filtrat dans une cuve (6.6) et mesurer l'absorbance avec le spectromètre (6.5) à 665 nm, 705 nm et 625 nm. (Les lectures effectuées à 705 nm et 625 nm servent à évaluer le bruit de fond).

10 Expression des résultats

La teneur en chlorophylle, exprimée en milligrammes par kilogramme de produit tel quel, est donnée par la formule

$$\frac{k \times A_{\text{corr}} \times V}{m \times l}$$

où

A_{corr} (l'absorbance corrigée) est égale à $A_{665} - (A_{705} + A_{625})/2$;

A_{665} est l'absorbance à 665 nm;

A_{705} est l'absorbance à 705 nm;

A_{625} est l'absorbance à 625 nm;

k est une constante qui est égale soit à 12,3 pour des spectromètres à largeur de bande spectrale réglée sur 2 nm, soit à la valeur déterminée dans l'annexe B pour des spectromètres qui ne sont pas en mesure d'atteindre une largeur de bande spectrale de 2 nm;

l est le parcours optique, en millimètres, de la cuve;

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai;

V est le volume, en millilitres, du filtrat.

Si l'on désire rapporter la teneur en chlorophylle au produit sec, tenir compte dans le calcul de la teneur

en eau de l'échantillon, déterminée conformément à l'ISO 665.

11 Précision

11.1 Résultats des essais interlaboratoires

Un essai interlaboratoire a été effectué par 16 laboratoires selon l'ISO 5725. Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité figurant dans le tableau 1 ont été obtenues.

Tableau 1 — Résultats statistiques des essais interlaboratoires

Échantillon	Colza A	Colza B	Colza C
Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants	12	12	10 ¹⁾
Moyenne de la teneur en chlorophylle, mg/kg	10,66	20,65	31,12
Écart-type de répétabilité, s_r	0,48	0,50	0,95
Coefficient de variation de répétabilité	0,05	0,02	0,03
Répétabilité, 2,83 s_r	0,65	0,70	2,67
Écart-type de reproductibilité, s_R	0,63	1,28	1,99
Coefficient de variation de reproductibilité	0,06	0,06	0,06
Reproductibilité, 2,83 s_R	1,13	4,56	5,56
1) Calcul après élimination de trois laboratoires avec une différence supérieure à 3 mg/kg entre deux répétitions.			

11.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne doit pas être supérieure aux valeurs suivantes:

teneur en chlorophylle comprise entre 10 mg/kg et 30 mg/kg:	1 mg/kg
teneur en chlorophylle supérieure à 30 mg/kg:	3 mg/kg

NOTE 2 Les valeurs ne sont pas fixées par des teneurs en chlorophylle inférieures à 10 mg/kg, du fait que l'industrie accepte une teneur allant jusqu'à 22 mg/kg.

11.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, ne doit pas être supérieure aux valeurs suivantes:

teneur en chlorophylle comprise entre
10 mg/kg et 30 mg/kg: 5 mg/kg

teneur en chlorophylle supérieure à
30 mg/kg: 6 mg/kg

NOTE 3 Les valeurs ne sont pas fixées par des teneurs en chlorophylle inférieures à 10 mg/kg, du fait que l'industrie accepte une teneur allant jusqu'à 22 mg/kg.

12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10519:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f4ad0-7a34-4743-993e-4baadc7b8a36/iso-10519-1992>

Annexe A (informative)

Informations sur les règles de sécurité et précautions à observer lors de la manipulation et le stockage des produits

A.1 Risques encourus

Consulter les fiches techniques fournies par le fabricant.

A.1.1 Les solvants préconisés dans la présente Norme internationale sont des liquides inflammables, à point d'éclair bas. Ils peuvent provoquer un dessèchement ou une irritation de la peau, des yeux et des muqueuses.

A.1.2 L'éther diéthylique peut former des peroxydes organiques au cours du stockage. Tous les peroxydes organiques sont des produits hautement inflammables et instables (explosifs). Ils sont dangereux en raison de leur extrême sensibilité à la chaleur, au frottement, aux chocs et à la lumière, ainsi qu'aux agents fortement oxydants et réducteurs.

A.2 Précautions à observer lors du stockage de l'éther diéthylique

Entreposer l'éther diéthylique loin de toute source de chaleur ou de lumière dans des récipients fermés, de préférence ceux qui sont fournis par le fabricant. Il convient d'apposer sur les récipients contenant de l'éther, des étiquettes indiquant les dates de réception, d'ouverture et d'expiration. Il est recommandé d'utiliser leur contenu dans le mois suivant l'ouverture. Si une bouteille date de plusieurs années, ou si l'on veut observer un dépôt solide autour du bouchon, il est conseillé de ne pas tenter de l'ouvrir (voir A.3).

A.3 Précautions à observer lors de la manipulation de l'éther diéthylique

Avant toute utilisation d'éther, un essai colorimétrique doit être effectué pour déceler la présence éventuelle de peroxydes à l'aide du mode opératoire suivant.

IMPORTANT – Cet essai ne doit pas être effectué si l'on observe la présence de cristaux dans le solvant.

Verser dans un tube en verre, 10 ml d'éther diéthylique puis 1 ml d'une solution à 10 % (V/V) d'iodure de potassium récemment préparée. Agiter

puis laisser reposer 1 min dans l'obscurité. L'apparition d'une coloration jaune dans la fraction aqueuse située à la base du tube indique la présence dans l'éther d'au moins 50 mg/kg de peroxydes.

Il convient de ne pas utiliser le solvant si l'on observe la présence de cristaux dans celui-ci. Si les peroxydes sont présents en quantité suffisante pour former un précipité (par exemple sous forme de cristaux), le récipient et son contenu doivent être mis de côté avec une extrême prudence (voir A.5).

Les éthers ne doivent jamais être distillés (par exemple, dans un extracteur) sauf si l'on est certain qu'ils ne contiennent pas de peroxydes. Il ne faut pas utiliser les bouteilles dans lesquelles la présence de peroxydes a été mise en évidence (voir A.5).

A.4 Précautions à observer lors de la manipulation des solvants

Pour manipuler les solvants, utiliser des lunettes de protection, des gants, et une blouse de laboratoire antistatique (sans polyester). Effectuer les manipulations dans un local bien ventilé (de préférence dans une hotte fermée), loin de toute source de chaleur, d'étincelles, ou d'une flamme nue. Effectuer tout transvasement important de solvants dans une hotte fermée. Procéder au transvasement avec prudence, car ces liquides sont non conducteurs et peuvent générer de l'électricité statique. Entreposer les volumes importants de solvants dans un endroit frais et ventilé. Les séparer des produits oxydants et les isoler d'autres matériaux combustibles.

A.5 Précautions relatives à l'évacuation des produits

A.5.1 Peroxydes organiques et précurseurs des peroxydes

Consulter systématiquement le responsable de la sécurité ou du service d'hygiène avant de procéder à l'évacuation d'éther contenant des peroxydes. La ligne de conduite à adopter dépendra de la teneur en peroxydes. Ne jamais vider d'éther contenant des peroxydes dans un évier.

A.5.2 Élimination des peroxydes contenus dans l'éther

Consulter systématiquement le responsable de la sécurité ou du service d'hygiène avant de procéder au traitement des éthers pour éliminer les peroxydes. On peut agiter l'éther avec un mélange de 25 % (V/V) de sulfate ferreux dans une solution à 50 % (V/V) d'acide sulfurique. Pour une bouteille d'éther de 2,5 l, il suffit normalement d'employer 50 ml de ce mélange, en agitant périodiquement

pendant 30 min. Il faut ensuite procéder à une déshydratation pour ramener l'éther à une forme utilisable.

A.5.3 Évacuation des solvants utilisés

L'évacuation des solvants utilisés dans les échantillons pour essai doit s'effectuer par le dispositif de vidange des solvants, en isolant le siphon avec 250 ml d'eau.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10519:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f4ad0-7a34-4743-993e-4baadc7b8a36/iso-10519-1992>

Annexe B (informative)

Étalonnage des spectromètres ne permettant pas l'obtention d'une largeur de bande spectrale de 2 nm

B.1 Principe

Préparation de solutions de chlorophylle A pure. Détermination, à l'aide de ces solutions, de la pente de la courbe d'étalonnage du spectromètre.

B.2 Réactifs

B.2.1 Éther diéthylique, de qualité analytique reconnue.

B.2.2 Chlorophylle A, solution étalon

Introduire environ 1 mg de chlorophylle A, cristallisée, de pureté égale ou supérieure à 95 %, dans une fiole jaugée de 10 ml, puis dissoudre et compléter jusqu'au trait avec de l'éther diéthylique (B.2.1).

B.3 Appareillage

B.3.1 Spectromètre, autre que l'appareil à étalonner, permettant d'effectuer des mesurages d'absorbance entre 600 nm et 700 nm, avec une largeur de bande spectrale inférieure à 2 nm. Cet instrument est nécessaire pour déterminer la concentration en chlorophylle A dans la solution étalon.

B.3.2 Micropipettes, capables de délivrer 0,200 ml, 0,400 ml, 0,600 ml, 0,800 ml et 1 000 ml.

B.3.3 Fioles jaugées, de 10 ml de capacité.

B.3.4 Spectromètre de travail, c'est-à-dire spectromètre, autre que celui défini en B.3.1, pour lequel un étalonnage est souhaitable.

B.4 Étalonnage

B.4.1 Détermination de la concentration en chlorophylle A dans la solution étalon

Transvaser 1,0 ml de la solution étalon de chlorophylle A (B.2.2) dans une fiole jaugée de 10 ml (B.3.3) et ajuster au trait avec de l'éther diéthylique (B.2.1). Mesurer l'absorbance de cette solution avec le spectromètre (B.3.1) à 660 nm (longueur d'onde du pic) et à 642,5 nm, en utilisant une cellule de 10 mm de parcours optique et une largeur de bande spectrale de 2 nm.

Calculer la concentration en chlorophylle A, en milligrammes par litre, dans la solution étalon à l'aide de la formule

$$\rho(\text{chlorophylle}) = 99,3 \times A_{660} - 7,8 \times A_{642,5}$$

où A_{660} est l'absorbance de la solution étalon de chlorophylle A, à 660 nm;

$A_{642,5}$ est l'absorbance de la solution étalon de chlorophylle A, à 642,5 nm.

B.4.2 Préparation de la courbe d'étalonnage

Dans une série de cinq fioles jaugées de 10,0 ml, introduire 0,200 ml, 0,400 ml, 0,600 ml, 0,800 ml et 1 000 ml de la solution étalon de chlorophylle A (B.2.2) dont la concentration a été calculée en B.4.1. Compléter les fioles jusqu'au trait-repère avec le solvant d'extraction (article 5).

NOTE 4 Les faibles quantités d'éther diéthylique présentées dans ces solutions n'affectent pas les résultats.

Mesurer l'absorbance corrigée A_{corr} (voir article 10) de ces solutions d'étalonnage avec le spectromètre de travail (B.3.4) et porter celle-ci vis-à-vis de la concentration en chlorophylle A dans les solutions. La pente de la courbe ainsi tracée est la constante k , en milligrammes par litre, par absorbance corrigée.

Annexe C
(informative)

Bibliographie

- [1] ISO 542:1990, *Graines oléagineuses — Échantillonnage*.
- [2] ISO 5725:1986, *Fidélité des méthodes d'essai — Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10519:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f4ad0-7a34-4743-993e-4baadc7b8a36/iso-10519-1992>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10519:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f4ad0-7a34-4743-993e-4baadc7b8a36/iso-10519-1992>