

---

---

**Corps gras d'origines animale et  
végétale — Détermination de la teneur en  
stérols individuels et totaux — Méthode par  
chromatographie en phase gazeuse**

*Animal and vegetable fats and oils — Determination of individual and total  
sterols contents — Gas chromatographic method*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 12228:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/52fcd37c-77d0-44fb-9a76-d045f7f151ff/iso-12228-1999>



## Sommaire

1	Domaine d'application .....	1
2	Références normatives .....	1
3	Définitions .....	1
4	Principe .....	1
5	Réactifs .....	2
6	Appareillage .....	2
7	Échantillonnage .....	3
8	Préparation de l'échantillon pour essai .....	3
9	Mode opératoire .....	3
10	Expression des résultats .....	5
11	Fidélité .....	7
12	Rapport d'essai .....	7
Annexe A (informative)	Résultats de l'essai interlaboratoires .....	10
Annexe B (informative)	Bibliographie .....	17

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/52fcd37c-77d0-44fb-9a76-d045171f511f/iso-12228-1999>

## 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 (CEI) 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 12228 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

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

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 12228:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/52fcd37c-77d0-44fb-9a76-d045f7f151ff/iso-12228-1999>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 12228:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/52fcd37c-77d0-44fb-9a76-d045f7f151ff/iso-12228-1999>

# Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la teneur en stérols individuels et totaux — Méthode par chromatographie en phase gazeuse

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination, par chromatographie en phase gazeuse, de la teneur et de la composition des stérols contenus dans les corps gras d'origines animale et végétale.

## 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 661:1989, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation de l'échantillon pour essai*.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*.

## 3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

### 3.1

#### composition des stérols

composition des stérols individuels contenus dans l'échantillon, en commençant par le cholestérol et en terminant par le  $\Delta^7$ -avénastérol (voir tableau 1), dans les conditions spécifiées par la présente Norme internationale

NOTE La composition est exprimée en pourcentage d'aire de pic, ramenée à 100 %.

### 3.2

#### teneur en stérol total

masse de la somme de tous les stérols individuels, déterminée selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale, en commençant par le cholestérol et en terminant par le  $\Delta^7$ -avénastérol (voir tableau 1), divisée par la masse de la prise d'essai

NOTE La teneur est exprimée en milligrammes pour 100 g.

## 4 Principe

Saponification d'une prise d'essai par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à ébullition sous reflux. Isolement de l'insaponifiable par extraction en phase solide sur une colonne d'oxyde d'aluminium. Cette colonne est utilisée pour retenir les savons tandis que les stérols traversent la colonne. Séparation de la fraction stérolique de l'insaponifiable par chromatographie sur couche mince, puis détermination de la composition qualitative et

quantitative de la fraction stérolique par chromatographie en phase gazeuse, en utilisant de la bétuline comme étalon interne.

## 5 Réactifs

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau de qualité 3, conformément à l'ISO 3696.

**5.1 Hydroxyde de potassium**, solution éthanolique,  $c(\text{KOH}) \approx 0,5 \text{ mol/l}$ .

Dissoudre 3 g d'hydroxyde de potassium dans 5 ml d'eau et diluer à 100 ml avec de l'éthanol (5.3). Il convient que la solution soit incolore ou de couleur paille.

**5.2 Solution étalon interne**, bétuline, 1,0 mg/ml en solution dans de l'acétone (voir note en 5.10).

NOTE Dans le cas de l'huile de grignons d'olive, qui est susceptible de contenir de la bétuline, il est recommandé d'utiliser comme étalon interne du 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol (voir tableau 1, pic 2).

**5.3 Éthanol**, d'une pureté minimale de 95 % (V/V).

**5.4 Oxyde d'aluminium**, neutre, de granulométrie comprise entre 0,063 mm et 0,200 mm, d'activité I.

**5.5 Éther diéthylique**, fraîchement distillé, exempt de peroxydes et de résidus.

**AVERTISSEMENT: L'éther diéthylique est hautement inflammable et peut engendrer la formation de peroxydes explosifs. Les limites d'explosion dans l'air sont comprises entre 1,7 % (V/V) et 48 % (V/V). Des précautions particulières doivent être prises lors de l'utilisation de cette substance.**

**5.6 Plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) au gel de silice**, disponibles dans le commerce, mesurant 20 cm  $\times$  20 cm, l'épaisseur de la couche étant de 0,25 mm.

**5.7 Solvant de développement**, hexane/éther diéthylique [1:1 (V/V)].

**5.8 Solution étalon pour chromatographie sur couche mince**, cholestérol = 1,0 mg/ml et bétuline = 5,0 mg/l dans de l'acétone.

**5.9 Réactif de révélation**, méthanol.

**5.10 Réactif silylant**, préparé en ajoutant 50  $\mu\text{l}$  de 1-méthyle imidazole à 1 ml de *N*-méthyle-*N*-(triméthylsilyl)-heptafluorobutyramide (MSHFBA).

NOTE Normalement, il est recommandé de ne pas utiliser d'autres réactifs silylants sauf si l'on prend la précaution particulière de s'assurer que les deux groupes -OH de la bétuline sont silylés. Dans le cas contraire, la bétuline peut montrer deux pics lors de la CPG.

## 6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

**6.1 Ballons à fond rond**, de 25 ml et 50 ml de capacité, à col rodé.

**6.2 Réfrigérant à reflux**, muni d'un joint rodé s'adaptant aux ballons (6.1).

**6.3 Colonne en verre**, munie d'un robinet en PTFE, d'un verre fritté et d'un réservoir d'une capacité de 100 ml, mesurant 25 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre interne.

**6.4 Évaporateur rotatif**, relié à une pompe à vide, avec un bain-marie maintenu à 40 °C.

**6.5 Cuve de développement**, en verre, muni d'un couvercle en verre rodé, pouvant être utilisé avec des plaques de 20 cm × 20 cm.

**6.6 Microseringue** ou **micropipette**, de 100 µl de capacité.

**6.7 Étuve**, maintenue à 105 °C ± 3 °C.

**6.8 Dessiccateur**, contenant un déshydratant pour la conservation des plaques.

**6.9 Tube de réaction**, conique, de 0,3 ml de capacité, munie d'un bouchon à vis et d'un joint d'étanchéité en PTFE, servant à la préparation des dérivés des stérols.

**6.10 Chromatographe en phase gazeuse**, équipé pour colonnes capillaires, avec injecteur-diviseur, détecteur à ionisation de flamme et enregistreur adéquat.

**6.11 Colonne capillaire**, en silice fondue ou en verre, de 25 m à 60 m de longueur, de 0,2 mm à 0,25 mm de diamètre intérieur, à phase stationnaire SE-54 (ou phase non polaire équivalente, avec une température limite d'au moins 280 °C à 300 °C); film d'environ 0,1 µm d'épaisseur.

**6.12 Microseringue** pour chromatographie en phase gazeuse, destinée à injecter des volumes de 1 µl.

**6.13 Balance analytique**, capable de peser à 0,001 g près et d'afficher les valeurs à 0,0001 g près.

## 7 Échantillonnage

iTeh STANDARD PREVIEW

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 5555 (voir la référence [1]).

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 661.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai

Peser, à 1 mg près, environ 250 mg de l'échantillon pour essai et les introduire dans un ballon de 25 ml (6.1).

Dans le cas des corps gras présentant une teneur en stérols inférieure à 100 mg par 100 g, effectuer la prise d'essai en utilisant une quantité trois fois plus élevée d'échantillon pour essai. Ajuster les réactifs et l'appareillage en conséquence.

### 9.2 Dosage

#### 9.2.1 Préparation de la colonne d'oxyde d'aluminium

Mettre en suspension 10 g d'oxyde d'aluminium (5.4) dans 20 ml d'éthanol (5.3) et verser la bouillie obtenue dans la colonne en verre (6.3). Laisser reposer l'oxyde d'aluminium et le solvant s'écouler hors de la colonne, jusqu'à ce que le niveau du solvant atteigne le sommet de la couche d'oxyde d'aluminium.

### 9.2.2 Extraction de l'insaponifiable

Ajouter exactement 1,00 ml de solution étalon interne (5.2) à la prise d'essai (9.1).

Ajouter 5 ml de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (5.1), ainsi que quelques granulés régulateurs d'ébullition. Relier le réfrigérant à reflux (6.2) au ballon et porter lentement son contenu à ébullition pendant 15 min. Arrêter de chauffer. Diluer **immédiatement** le contenu du ballon, pendant qu'il est encore chaud, avec 5 ml d'éthanol (5.3) et faire tourner ou agiter pour obtenir l'homogénéisation.

Prélever, à l'aide d'une pipette, 5 ml de cette solution et les verser dans la colonne d'oxyde d'aluminium (9.2.1) préparée. Recueillir la substance résultant de l'éluion dans un ballon de 50 ml à fond rond (6.1) et laisser reposer la colonne jusqu'à ce que le niveau du solvant ait atteint la tête de la colonne. Procéder à l'éluion de l'insaponifiable, en utilisant tout d'abord 5 ml d'éthanol (5.3), puis avec 30 ml d'éther diéthylique (5.5), en appliquant un débit d'environ 2 ml/min. Évaporer les solvants contenus dans le ballon, à l'aide de l'évaporateur rotatif (6.4).

**AVERTISSEMENT:** L'emploi de la colonne à l'oxyde d'aluminium est *fondamental* pour ce mode opératoire. Elle ne peut pas être remplacée par d'autres absorbants ni par d'autres solvants d'extraction.

### 9.2.3 Chromatographie sur couche mince

Dissoudre l'insaponifiable obtenu en 9.2.2 dans une petite quantité d'éther diéthylique (5.5). Appliquer la solution sous forme de bande, à une distance de 2 cm du bord inférieur d'une plaque CCM (5.6), en utilisant une microseringue (6.6). Laisser un espace d'au moins 3 cm de chaque bord de la plaque. Appliquer une goutte de 5 µl de solution étalon CCM (5.8) à 1,5 cm du bord. Remplir la cuve de développement (6.5) avec environ 100 ml de solvant de développement (5.7). Mettre la plaque dans la cuve et procéder au développement jusqu'à ce que le solvant atteigne le bord supérieur. Oter la plaque de la cuve et laisser le solvant s'évaporer sous une hotte aspirante.

(standards.iteh.ai)

NOTE Il n'est pas nécessaire, à ce stade, de procéder au transvasement quantitatif du matériau (9.2.2) sur la plaque CCM. Il est possible d'utiliser un appareillage automatique pour l'application des dépôts d'échantillons. Aucune chambre de saturation n'est utilisée.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/52fcd37c-77d0-44fb-9a76-d045f7f151ff/iso-12228-1999>

### 9.2.4 Isolement des stérols

Vaporiser les plaques avec du méthanol (5.9) jusqu'à ce que la couleur blanche des zones stérolique et bétulinique ressorte sur un fond translucide (plus sombre). La zone de bétuline apparaît légèrement en dessous de la zone des stérols. Marquer les zones à hauteur des dépôts d'étalon, 2 mm au-dessus et 4 mm au-dessous des zones visibles (voir figure 1). Gratter entièrement cette partie de la couche à l'aide d'une spatule et recueillir quantitativement la silice dans un bécher de faible capacité.

NOTE La marge plus grande prise sur le bord inférieur des zones visibles (4 mm contre 2 mm sur le bord supérieur) est une précaution visant à éviter les pertes partielles de bétuline à ce stade. L'huile de tournesol peut présenter trois bandes ( $\Delta^5$ -stérols,  $\Delta^7$ -stérols et bétuline).

Ajouter 0,5 ml d'éthanol au gel de silice recueilli. Procéder à l'extraction du gel de silice à l'intérieur du bécher, à trois reprises, en utilisant 5 ml d'éther diéthylique (5.5) et en le filtrant dans un ballon (6.1). Réduire les extraits d'éther combinés à environ 1 ml à l'aide de l'évaporateur rotatif (6.4) et transvaser la solution restante dans le tube de réaction (6.9). Éliminer le solvant contenu dans le tube de réaction en appliquant un courant d'azote.

### 9.2.5 Préparation des triméthylsilyléthers stéroliques

Ajouter 100 µl de réactif silylant (5.10) dans le tube de réaction (6.9) contenant les stérols isolés. Obturer et faire chauffer le tube pendant 15 min à l'intérieur de l'étuve à 105 °C. Laisser le flacon de réaction refroidir à la température ambiante et injecter directement la solution dans le chromatographe en phase gazeuse (6.10).

### 9.2.6 Chromatographie en phase gazeuse

Optimiser le programme de température et le débit du courant gazeux, de façon à obtenir des chromatogrammes similaires à ceux de la figure 2. Faire un essai de séparation à l'aide des fractions de stérols silylés provenant d'huiles connues, comme indiqué dans la figure 2.



NOTE 1 Les paramètres suivants ont fait l'objet d'essais et se sont révélés satisfaisants: colonne de CPG: SE-54, 50 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur; 0,10 µm d'épaisseur de film; gaz vecteur: H<sub>2</sub>; vitesse du gaz vecteur: 36 cm/s; division: 1:20; détecteur/injecteur: 320 °C; programme de température: entre 240 °C et 255 °C à 4 °C/min; volume injecté: 1 µl. Des colonnes capillaires de qualité équivalente peuvent être utilisées.

NOTE 2 Il est possible d'employer une solution étalon contenant du cholestérol, du campestérol, du stigmastérol et du sitostérol pour contrôler les temps de rétention. Effectuer un essai à blanc (par exemple cholestérol) afin de dépister une contamination éventuelle provenant des solvants, parois de verre, filtre, empreintes de doigts, etc.

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Identification des stérols

Pour identifier les stérols présents dans l'échantillon pour essai, déterminer les temps de rétention relatifs (TRR) en divisant le temps de rétention (TR) du stérol concerné par le TR du cholestérol et/ou de la bétuline. Le tableau 1 indique les TRR des différents stérols correspondant respectivement au cholestérol (TRRC) et à la bétuline (TRRB).

NOTE Les TRR mentionnés dans le tableau 1 (déterminés selon les conditions de la note 1 en 9.2.6) ont uniquement pour but de favoriser l'identification des stérols individuels et d'illustrer la séquence d'élution (voir également la figure 2). Les valeurs de TRR réelles peuvent s'écarter légèrement des TRR mentionnés dans le tableau 1, du fait de la variabilité du TRR en fonction des conditions expérimentales (type et longueur de la colonne CPG, programme de température et qualité de la phase stationnaire).

### 10.2 Composition des stérols

Calculer l'aire de pic,  $C_i$ , du stérol  $i$ , en pour cent, à l'aide de l'équation suivante:

$$C_i = \frac{A_i}{\sum A} \times 100 \%$$

où

$A_i$  est l'aire de pic du stérol  $i$ ;

$\sum A$  est la somme des aires de pic relatives à l'ensemble des stérols (pics 1 à 16).

iTeH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 12228:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/52fcd37c-77d0-44fb-9a76-d045f7f151ff/iso-12228-1999>

**Tableau 1 — Identification par temps de rétention relatif des stérols individuels et de la bétuline (phase stationnaire SE-54)**

Pic	Dénominations usuelles	Stérols	TRRC	TRRB
1	Cholestérol	Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	1,00	0,44
2	Cholestanol	5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\beta$ -ol	1,02	0,45
3	Brassicastérol	[24S]-24-Méthyl cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol	1,09	0,48
4	24-Méthylène cholestérol	24-Méthylène cholesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol	1,21	0,53
5	Campestérol	[24R]-24-Méthyl cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	1,23	0,54
6	Campestanol	[24R]-24-Méthyl cholestan-3 $\beta$ -ol	1,25	0,55
7	Stigmastérol	[24S]-24-Éthyl cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol	1,31	0,57
8	$\Delta$ 7-Campestérol	[24R]-24-Méthyl cholest-7-en-3 $\beta$ -ol	1,38	0,59
9	$\Delta$ 5,23-Stigmastadiérol	[24R,S]-24-Éthyl cholesta-5,23-dien-3 $\beta$ -ol	1,40	0,60
10	Clérostérol	[24S]-24-Éthyl cholesta-5,25-dien-3 $\beta$ -ol	1,42	0,62
11	Sitostérol	[24R]-24-Éthyl cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	1,47	0,64
12	Sitostanol	[24R]-24-Éthyl cholestan-3 $\beta$ -ol	1,50	0,65
13	$\Delta$ 5-Avé nastérol	[24Z]-24(28)-Éthylidène cholesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol	1,52	0,66
14	$\Delta$ 5,24-Stigmastadiérol	[24R,S]-24-Éthyl cholesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol	1,59	0,69
15	$\Delta$ 7-Stigmastérol	[24R,S]-24-Éthyl cholesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	1,65	0,72
16	$\Delta$ 7-Avé nastérol	[24Z]-24(28)-Éthylidène cholesta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol	1,70	0,74
X	Érythrodiol		2,03	0,88
Y	Uvaol		2,17	0,95
17	Bétuline	Lup-20[29]-ene-3 $\beta$ ,28-diol	2,30	1,00
TRRC: Temps de rétention relatif calculé sur la base du cholestérol = 1,00.				
TRRB: Temps de rétention relatif calculé sur la base de la bétuline = 1,00.				
NOTE Le sitostérol peut se trouver en coélution avec le $\Delta$ 7,22,25-stigmastatriérol et avec le $\Delta$ 7,22,25-stigmastadiérol. Le [24R]-24-Éthyl cholesta-7,25 (27)-dien-3 $\beta$ -ol est présent dans les stérols de tournesol et dans l'huile de graine de potiron et peut se trouver en coélution avec le pic 14 ( $\Delta$ 5,24-stigmastadiérol).				

### 10.3 Détermination de la teneur en stérols totaux

Pour les besoins de la présente méthode, il est supposé que les facteurs de réponse de tous les stérols et de la bétuline sont égaux.

NOTE Lors de plusieurs essais, les stérols et la bétuline silylés ont, en quantité égale, donné une réponse identique sur le détecteur, en utilisant un détecteur à ionisation de flamme dans ces conditions.

Calculer la teneur en stérol total,  $S$ , en milligrammes pour 100 g de matière grasse, à l'aide de l'équation suivante:

$$S = \frac{\sum(A) \times m_B}{A_B \times m_T} \times 100$$

où

$m_B$  est la masse de la bétuline, en milligrammes;

$\sum(A)$  est la somme des aires de pic relatives à l'ensemble des stérols individuels présents;

$A_B$  est l'aire de pic de l'étalon interne de bétuline;

$m_T$  est la masse de l'échantillon pour essai, en grammes.

Pour calculer la teneur en stérols totaux, prendre en compte tous les pics de stérols, en commençant par le cholestérol et en terminant par le  $\Delta$ 7-avénastérol (pic 16), exceptés l'érythrodiol et l'uvaol (pics X et Y).

## 11 Fidélité

### 11.1 Essai interlaboratoires

Les détails d'un essai interlaboratoires relatif à la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe A. Les valeurs dérivées de cet essai peuvent ne pas s'appliquer aux plages de concentrations ou matrices autres que celles données.

### 11.2 Limite de répétabilité, $r$

La limite de répétabilité ( $r$ ) est la valeur au-dessous de laquelle ou à laquelle on doit s'attendre à ce que se situe, avec une probabilité de 95 %, la différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus dans des conditions de répétabilité.

Les conditions de répétabilité sont les conditions pour lesquelles des résultats d'essai indépendants sont obtenus à l'aide de la même méthode sur des matériaux d'essai identiques, dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps.

### 11.3 Limite de reproductibilité, $R$

La limite de reproductibilité ( $R$ ) est la valeur au-dessous de laquelle ou à laquelle on doit s'attendre à ce que se situe, avec une probabilité de 95%, la différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus dans des conditions de reproductibilité.

Les conditions de reproductibilité sont les conditions pour lesquelles des résultats d'essai indépendants sont obtenus à l'aide de la même méthode sur des matériaux d'essai identiques, dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents.

## 12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer:

- tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- la méthode d'échantillonnage utilisée, si elle est connue;
- la méthode d'essai utilisée, avec référence à la présente Norme internationale;
- tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou considérés comme facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le(s) résultat(s) d'essai;
- le(s) résultat(s) d'essai obtenu(s), ou
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.