
**Corps gras d'origines animale et
végétale — Détermination de la teneur en
benzo[a]pyrène — Méthode par
chromatographie liquide à haute
performance à polarité de phase inversée**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Animal and vegetable fats and oils — Determination of benzo[a]pyrene
content — Reverse-phase high-performance liquid chromatography method*
(standards.iteh.ai)

ISO 15302:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/429d415d-6b65-4cd9-8a93-74c2a64c932c/iso-15302-1998>



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 15302 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.

© ISO 1998

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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
Internet central@iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la teneur en benzo[a]pyrène — Méthode par chromatographie liquide à haute performance à polarité de phase inversée

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination du benzo[a]pyrène dans les corps gras comestibles bruts ou raffinés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à polarité de phase inversée par détection fluorimétrique, dans la gamme de 0,1 µg/kg à 10 µg/kg.

2 Référence normative

La norme suivante contient 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, l'édition indiquée était 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 l'édition la plus récente de la norme indiquée 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*.

3 Principe

Adsorption d'une quantité appropriée d'échantillon sur une colonne d'alumine, puis élution à l'éther de pétrole de tout benzo[a]pyrène présent et analyse consécutive de l'éluat par CLHP à l'aide d'un détecteur fluorimétrique.

4 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. Lors de l'utilisation de solvants ayant une qualité analytique autre que celle recommandée, effectuer un essai à blanc et consigner les résultats de cet essai.

4.1 Eau, ayant fait l'objet d'une double distillation, filtrée à travers un microfiltre moléculaire ayant des pores de 0,45 µm; de l'eau déionisée, obtenue à partir de systèmes de déminéralisation d'eau, peut également être utilisée.

4.2 Éther de pétrole (point d'ébullition se situant dans une plage comprise entre 40 °C et 60 °C) ou **hexane** redistillé sur des pastilles d'hydroxyde de potassium (4 g/l).

4.3 Acétonitrile, pour CLHP.

4.4 Tétrahydrofurane, pour CLHP.

4.5 Toluène, pour CLHP.

4.6 Sulfate de sodium, anhydre, en grains.

4.7 Alumine, activité 4, préparée à partir d'oxyde d'aluminium neutre, activité supérieure à 1, désactivée par addition de 10 ml d'eau distillée à 90 g d'alumine.

AVERTISSEMENT — LA RÉACTION EST EXOTHERMIQUE ET IL PEUT Y AVOIR ACCUMULATION DE PRESSION.

Agiter le conteneur pendant 15 min environ et laisser le contenu parvenir à l'équilibre pendant 24 h. Conserver l'alumine dans un récipient fermé à température ambiante.

4.8 Benzo[a]pyrène, pur à 99,0 %.

AVERTISSEMENT — LE BENZO[a]PYRÈNE EST UN CARCINOGENÈ BIEN CONNU. IL CONVIENT DE L'UTILISER SOUS HOTTE POUR TOUS LES TRAVAUX, EN PORTANT DES GANTS AFIN DE RÉDUIRE L'EXPOSITION AU MINIMUM.

4.9 Solutions de benzo[a]pyrène¹⁾

4.9.1 Solution mère

Peser, à 0,1 mg près, environ 12,5 mg de benzo[a]pyrène dans une fiole jaugée de 25 ml, les dissoudre dans le toluène (4.5) et remplir jusqu'au trait.

Cette solution contient environ 0,5 mg/ml de benzo[a]pyrène. Elle se conserve pendant au moins six mois dans l'obscurité à 4 °C.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4.9.2 Solutions étalons

Préparer deux solutions étalons contenant respectivement à peu près 0,2 µg/ml et 0,01 µg/ml de benzo[a]pyrène en diluant les parties aliquotes de la solution mère (4.9.1) avec de l'acétonitrile (4.3).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/429d415d-6b65-4cd9-8a93-74c2a64c932c/iso-15302-1998>

5 Appareillage

Appareillage courant de laboratoire et notamment:

5.1 Colonne de chromatographie en verre, de 300 mm de longueur, 15 mm de diamètre intérieur, munie de disques en verre fritté et d'un robinet en polytétrafluoroéthylène (PTFE).

5.2 Bains d'eau (deux), maintenus à 35 °C ± 1 °C et 65 °C ± 1 °C.

5.3 Évaporateur rotatif

Il est permis d'utiliser un évaporateur rotatif sous vide et un bain d'eau à 40 °C. Il convient de veiller à empêcher toute contamination croisée. Nettoyer soigneusement le système entre les déterminations.

5.4 Chromatographe liquide à haute performance, comprenant une pompe CLHP, une vanne d'injection avec boucle d'échantillonnage de 10 µl, une colonne à polarité de phase inversée, un intégrateur électronique et un enregistreur de diagramme.

NOTE En cas d'utilisation d'un autoéchantillonneur, il convient de rincer la boucle d'échantillonnage à l'acétonitrile entre les injections consécutives.

1) Un matériau de référence approprié est disponible au Bureau de Référence de la Commission des Communautés Européennes (BCR), rue de la Loi 200, B-1049 Bruxelles, Belgique.

5.5 Colonnes d'analyse CLHP

5.5.1 Colonne de garde à polarité de phase inversée, pouvant séparer le benzo[*a*]pyrène des coextraits, ainsi que précolonne appropriée [par exemple en acier inoxydable, de 75 mm de longueur, 4,6 mm de diamètre intérieur, garnie de Lichrosorb RP-18²) (granulométrie de 5 µm)].

5.5.2 Colonne CLHP à polarité de phase inversée, de 250 mm de longueur, 4,6 mm de diamètre intérieur (acier inoxydable), pour hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (par exemple Chromspher 5 PAH ou Vydac 201 TP5)³).

5.6 Détecteur fluorimétrique, avec une longueur d'onde d'émission à 406 nm (fente de 10 nm) et une longueur d'onde d'excitation à 384 nm (fente de 10 nm). Le détecteur doit présenter les performances requises pour réaliser l'analyse.

5.7 Miniflacons à bord serti, d'un volume d'environ 1 ml, munis de septums recouverts d'une couche de Teflon et de bouchons en aluminium.

5.8 Sertisseuse manuelle, permettant de serrer les bouchons sur les flacons.

5.9 Pipettes jetables.

6 Échantillonnage

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.

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

ISO 15302:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/429d415d-6b65-4cd9-8a93-4c2a649920/iso-15302-1998>

7 Préparation de l'échantillon pour essai

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

8 Mode opératoire

8.1 Récupération de l'échantillon

8.1.1 Peser environ 2 g d'échantillon de corps gras, à 0,001 g près, et les verser dans une fiole jaugée de 10 ml. Dissoudre dans l'éther de pétrole (4.2) et diluer jusqu'au trait.

8.1.2 Remplir la colonne de chromatographie (5.1) jusqu'à mi-hauteur d'éther de pétrole (4.2). Peser rapidement 22 g d'alumine (4.7), les verser dans un petit bécher et transvaser immédiatement l'alumine dans la colonne, en accélérant la décantation de l'alumine en tapotant doucement la colonne.

8.1.3 Ajouter le sulfate de sodium anhydre (4.6) jusqu'en haut de la colonne afin de constituer une couche d'environ 30 mm d'épaisseur.

2) Le Lichrosorb RP-18 est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. 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 du produit ainsi désigné.

3) Chromspher 5 PAH et Vydac 201 TP5 sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. 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 des produits ainsi désignés.

8.1.4 Ouvrir le robinet et laisser l'éther de pétrole affleurer la partie supérieure de la couche de sulfate de sodium.

8.1.5 Placer une fiole jaugée de 20 ml sous la colonne.

8.1.6 À l'aide d'une pipette, verser 2,00 ml de solution de corps gras (8.1.1) sur la colonne. Rincer la colonne en utilisant des quantités minimales d'éther de pétrole, en laissant la couche de solvant pénétrer dans la couche de sulfate de sodium entre les rinçages.

8.1.7 Éluer la colonne à l'éther de pétrole (4.2) à un débit d'environ 1 ml/min, en éliminant les premiers 20 ml d'éluat et en recueillant les 60 ml d'éluat suivants dans une fiole à fond rond de 100 ml.

8.1.8 Évaporer l'éluat dans le bain d'eau (5.2), réglé à 65 °C, jusqu'à environ 0,5 ml à 1,0 ml et transvaser la solution concentrée dans un miniflacon à bord serti (5.5) prépesé (à 0,1 mg près).

8.1.9 Poursuivre l'évaporation du miniflacon dans le bain d'eau (5.2) réglé à 35 °C sous un flux modéré d'azote (environ 25 ml/min) jusqu'à dessiccation presque totale. Rincer la fiole à fond rond avec environ 1 ml d'éther de pétrole et transvaser quantitativement le liquide de rinçage dans le miniflacon, en poursuivant l'évaporation sous azote. Répéter le rinçage et transvaser une nouvelle fois dans le miniflacon.

8.1.10 Poursuivre l'évaporation à 35 °C sous azote jusqu'à dessiccation.

8.1.11 Peser le miniflacon à 0,1 mg près et calculer la masse du résidu.

8.1.12 Boucher le miniflacon avec le septum recouvert d'une couche de Téflon et le bouchon en aluminium et conserver à 4 °C.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

8.2 Chromatographie liquide à haute performance

8.2.1 Utiliser comme solvant d'éluion un mélange d'acétonitrile (4.3) et d'eau (4.1) à 88/12 (V/V). Dégazer le solvant d'éluion pour éliminer l'oxygène afin d'éviter l'extinction de fluorescence. Effectuer une purge à l'hélium ou à l'aide d'un système en ligne de dégazage sous vide.

8.2.2 Éluer à un débit d'environ 1 ml/min.

8.2.3 Préparer quatre dilutions des solutions étalons de benzo[a]pyrène (4.9.2) de manière que l'injection de 10 µl de chacune d'elles donne des relevés correspondant à 0,04 ng, 0,2 ng, 1,0 ng et 2,0 ng de benzo[a]pyrène. À partir de ces relevés, construire une courbe d'étalonnage à quatre points en utilisant les surfaces des pics de l'intégrateur et de l'enregistreur de diagramme.

8.2.4 Le tétrahydrofurane s'est avéré être le solvant optimal pour l'analyse des résidus des corps gras à la suite de la procédure de récupération (8.1). L'injection de volumes dépassant les 10 µl spécifiés pose des problèmes. Ne pas conserver les échantillons dans le tétrahydrofurane pendant une période prolongée car le benzo[a]pyrène n'est pas stable dans ce solvant.

8.3 Analyse de l'échantillon

8.3.1 Injecter 20 µl de tétrahydrofurane (4.4) dans le miniflacon contenant le résidu épuré (8.1.12). Dissoudre le résidu en remuant avec précaution, tout en évitant tout contact du solvant avec le septum.

Des niveaux de benzo[a]pyrène compris entre 0,1 µg/kg et 10 µg/kg peuvent être déterminés à l'aide de la courbe d'étalonnage (8.2.3). Pour les concentrations supérieures à 10 µg/kg, il convient de diluer encore la solution de résidu (8.3.2) avec du tétrahydrofurane ou bien d'injecter un volume inférieur à 10 µl (8.3.2).

8.3.2 Injecter dans la colonne CLHP un volume connu avec exactitude d'environ 10 µl de résidu dissous et lancer le chromatogramme. Il convient de porter attention sur le fait de ne pas introduire plus de 1,5 mg de résidu dans la colonne. Si une quantité plus importante de résidu est présente, la quantité de tétrahydrofurane doit être ajustée ou l'étape de récupération de l'échantillon doit être répétée.

9 Expression des résultats

Calculer la teneur en benzo[a]pyrène de l'échantillon pour essai avec la formule:

$$w = \frac{m_s}{V_3} \times \left(V_2 + \frac{m_r}{\rho} \right) \times \frac{V_0}{m \times V_1}$$

où

w est la teneur en benzo[a]pyrène, en microgrammes par kilogramme, de l'échantillon pour essai;

m_s est la masse, en nanogrammes, de benzo[a]pyrène, lue à partir de la courbe d'étalonnage (8.2.3) ;

m_r est la masse, en milligrammes, de résidu dans le miniflacon obtenu en 8.1.11;

ρ est la densité supposée, en milligrammes par microlitre, du résidu dans le miniflacon obtenu en 8.1.11 ($\rho = 0,8 \text{ mg}/\mu\text{l}$);

V_2 est le volume, en microlitres, de tétrahydrofurane ajouté dans le flacon en 8.3.1 ($V_2 = 20 \mu\text{l}$);

V_3 est le volume, en microlitres, de tétrahydrofurane injecté dans le chromatographe;

V_0 est le volume, en millilitres, dans lequel l'huile est dissoute ($V_0 = 10 \text{ ml}$);

V_1 est le volume, en millilitres, introduit dans la colonne en oxyde d'aluminium ($V_1 = 2 \text{ ml}$);

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

Exprimer les résultats à 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ près.

ISO 15302:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/429d415d-6b65-4cd9-8a93-74c2a64c932c/iso-15302-1998>

10 Fidélité

10.1 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 par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, ne dépassera que dans 5 % des cas au plus la limite de répétabilité (r) indiquée dans le tableau A.1.

10.2 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats individuels, 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 dépassera que dans 5 % des cas au plus la limite de reproductibilité (R) indiquée dans le tableau A.1.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit spécifier

- tout renseignement nécessaire 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 spécifiés dans la présente Norme internationale, ou considérés comme facultatifs, ainsi que les incidents susceptibles d'avoir agi sur le(s) résultat(s) d'essai;
- le résultat d'essai obtenu;
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15302:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/429d415d-6b65-4cd9-8a93-74c2a64c932c/iso-15302-1998>

Annexe A (informative)

Résultats de l'essai interlaboratoire

Un essai interlaboratoire, effectué au niveau international en 1989 par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA) avec la participation de 23 laboratoires, dont chacun a obtenu deux résultats d'essai sur chaque échantillon, a donné les résultats statistiques (évalués conformément à l'ISO 5725⁴) présentés dans le tableau A.1. Les échantillons ont été dopés de niveaux connus de benzo[*a*]pyrène.

Tableau A.1 — Résultats statistiques

| Lot d'échantillons | Huile de poisson | | | Huile de colza | | |
|--|------------------|------|------|----------------|------|------|
| | A | B | C | A | B | C |
| Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants | 10 | 10 | 10 | 11 | 11 | 11 |
| Nombre d'aberrants (laboratoires) | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Nombre de résultats acceptés | 240 | 240 | 240 | 264 | 264 | 264 |
| Valeur moyenne (µg/kg d'échantillon) | 4,87 | 3,08 | 0,98 | 4,39 | 2,78 | 0,99 |
| Valeur vraie ou acceptée (µg/kg) | 5,35 | 3,45 | 1,15 | 4,85 | 2,95 | 1,15 |
| Écart-type de répétabilité s_r (µg/kg) | 0,64 | 0,20 | 0,24 | 0,73 | 0,35 | 0,27 |
| Coefficient de variation de répétabilité, en % | 13,1 | 6,5 | 24,6 | 16,6 | 12,6 | 27,4 |
| Limite de répétabilité r ($2,8 \times s_r$) | 1,79 | 0,56 | 0,67 | 2,04 | 0,98 | 0,76 |
| Écart-type de reproductibilité s_R (µg/kg) | 1,09 | 0,54 | 0,29 | 0,77 | 0,67 | 0,41 |
| Coefficient de variation de reproductibilité, en % | 22,4 | 17,6 | 29,4 | 17,5 | 24,0 | 41,0 |
| Limite de reproductibilité R ($2,8 \times s_R$) | 3,05 | 1,52 | 0,80 | 2,16 | 1,87 | 1,14 |

NOTE 1 La répétabilité est meilleure pour l'huile de colza que pour l'huile de poisson. La répétabilité pour l'huile de poisson est comparable à la valeur obtenue lors de l'essai préliminaire effectué au sein d'une organisation industrielle (10 laboratoires), reporté séparément.

NOTE 2 Selon la référence [3], pour qu'une méthode analytique soit acceptable, la reproductibilité relative doit se situer à environ 45 % au niveau 1 µg/kg, et à 35 % au niveau 5 µg/kg. L'échelle donnée par ce critère rejoint tout à fait les résultats de la présente étude.

4) L'ISO 5725:1986 (à présent annulée) a été utilisée pour obtenir les valeurs de fidélité.