
**Corps gras d'origines animale et
végétale — Dosage des stigmastadiènes
dans les huiles végétales —**

Partie 1:

Méthode par chromatographie en phase
gazeuse sur colonne capillaire (Méthode de
référence)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Animal and vegetable fats and oils — Determination of stigmastadienes in
vegetable oils*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10e4c918-e65b-4ee7-9556->

*Part 1: Method using capillary-column gas chromatography (Reference
method)*



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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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 15788-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

L'ISO 15788 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Corps gras d'origines animale et végétale — Dosage des stigmastadiènes dans les huiles végétales*:

- *Partie 1: Méthode par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire*
- *Partie 2: Méthode par chromatographie liquide à haute performance*

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 15788 est donnée uniquement à titre d'information.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10e4c918-e65b-4ee7-9556-83ef7c395bd9/iso-15788-1-1999>

© ISO 1999

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 iso@iso.ch

Imprimé en Suisse

Introduction

Les traitements thermiques qu'impliquent les processus de raffinage entraînent la formation de quantités significatives d'hydrocarbures dans les huiles végétales [1]. Le plus abondant des hydrocarbures trouvés dans toutes les huiles végétales raffinées est le 3,5-stigmastadiène, stérène dérivé du β -sitostérol par déshydratation [2]. Le 3,5-stigmastadiène est formé en même temps que de petites quantités de 2,4-isomère, les deux substances pouvant se confondre sous un même pic, bien défini sur le chromatogramme obtenu lors de l'analyse de la fraction hydrocarbonée sur une colonne à faible polarité [3]. Il est donc possible de quantifier la somme des deux isomères par analyse chromatographique en phase gazeuse de la fraction hydrocarbonée stéroïdale [2] [4].

Alors que pour l'huile d'olive vierge par exemple, les processus habituels de production (sous pression ou par centrifugation) ne donnent pas de quantités mesurables de stigmastadiènes (moins de 0,01 mg/kg), dans les résidus d'huile d'olive brute, on en trouve en petites concentrations (entre 0,2 mg/kg et 3 mg/kg), par suite du chauffage à haute température subi par ces résidus pendant le séchage.

Les stigmastadiènes se forment pendant le processus de raffinage, à tous les stades impliquant une forte montée en température, tels que la décoloration ou la désodorisation; le premier stade, dû à l'emploi de terre à blanchir acide, en génère toutefois davantage que le second [2]. Selon les conditions rencontrées pendant le processus de raffinage, les concentrations en stigmastadiènes des huiles végétales raffinées disponible dans le commerce seront comprises entre 1 mg/kg et 120 mg/kg. L'évaluation des stigmastadiènes permet donc non seulement d'identifier les huiles qui ont subi un traitement thermique, mais également de détecter de petites quantités d'huiles végétales raffinées dans les huiles vierges.

Une méthode de dosage des stigmastadiènes ainsi que les résultats d'une étude interlaboratoires effectuée sous les auspices du Conseil international de l'huile d'olive ont été présentés à la Commission huiles, corps gras et dérivés de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA). La teneur en stigmastadiènes a été adoptée comme critère d'identification des huiles d'olive vierges et la méthode d'analyse pertinente a été adoptée comme méthode normalisée internationale.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15788-1:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10e4c918-e65b-4ee7-9556-83ef7c395bd9/iso-15788-1-1999>

Corps gras d'origines animale et végétale — Dosage des stigmastadiènes dans les huiles végétales —

Partie 1:

Méthode par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (Méthode de référence)

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 15788 spécifie une méthode de dosage des stigmastadiènes dans les huiles végétales vierges contenant de faibles concentrations de ces hydrocarbures, et notamment dans l'huile d'olive vierge.

Cette méthode est applicable à toutes les huiles végétales bien que les mesurages ne soient fiables que lorsque la teneur en hydrocarbures se situe entre 0,01 mg/kg et 4,0 mg/kg. Elle permet de détecter la présence d'huiles végétales raffinées (d'olive, de grignon d'olive, de tournesol, de palme, etc.) dans les huiles d'olive vierges, dans la mesure où les huiles raffinées renferment des stigmastadiènes, alors que les huiles vierges obtenues par pression à froid n'en renferment pas.

2 Principe

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10e4c918-e65b-4ee7-9556-83ef7c395bd9/iso-15788-1-1999>

Isolation de l'insaponifiable. Séparation de la fraction hydrocarbonée stéroïdale par chromatographie sur colonne remplie de gel de silice et analyse de celle-ci par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3 Réactifs

N'utiliser que des réactifs de qualité analytique reconnue et, sauf indication contraire, de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1 Hexane, ou mélange d'alcanes dont le point d'ébullition est compris entre 65 °C et 70 °C, distillé sur colonne rectificatrice.

L'hexane doit être redistillé pour éliminer les impuretés.

3.2 Éthanol, 96 % (fraction volumique).

3.3 Sulfate de sodium anhydre.

3.4 Hydroxyde de potassium alcoolique, concentration 50 g par 500 ml.

Ajouter 10 ml d'eau à 50 g d'hydroxyde de potassium, agiter, puis diluer le mélange à 500 ml avec de l'éthanol.

La solution d'hydroxyde de potassium alcoolique vire au brun lorsqu'on la laisse reposer. Il convient de la préparer extemporanément chaque jour et de la conserver dans des flacons en verre sombre bien bouchés.

3.5 Gel de silice 60¹⁾, pour chromatographie sur colonne, 70 à 230 mesh.

En général il est possible d'utiliser le gel de silice directement au sortir de son conditionnement sans aucun traitement. Certains lots de silice peuvent toutefois présenter une faible activité entraînant une mauvaise séparation chromatographique. Dans ce cas il est recommandé de traiter le gel de silice de la manière suivante.

Activer le gel de silice en le chauffant à 550 °C pendant au moins 4 h. Après chauffage, placer le gel de silice dans un dessiccateur pendant qu'il refroidit, puis le transférer dans un flacon bouché. Ajouter 2 % d'eau et agiter jusqu'à disparition des grumeaux et écoulement libre de la poudre.

Si les chromatogrammes obtenus avec les lots de gel de silice donnent des pics qui interfèrent les uns avec les autres, il convient de traiter le gel de la manière indiquée ci-dessus. Il est possible également d'utiliser du gel de silice extra pur 60¹⁾.

3.6 3,5-Cholestadiène²⁾, de pureté 99 % (fraction massique), solution mère dans de l'hexane, concentration 10 mg par 50 ml.

3.7 3,5-Cholestadiène, solution étalon dans de l'hexane, concentration 1 mg par 50 ml, obtenue par dilution de la solution mère (3.6).

NOTE Lorsqu'elles sont maintenues à une température inférieure à 4 °C, les solutions (3.6) et (3.7) ne se détériorent pas avant un délai de 4 mois au moins.

3.8 *n*-Nonacosane, solution dans de l'hexane, concentration d'environ 10 mg par 100 ml.

3.9 3,5-Stigmastadiène³⁾ (24-éthyl-cholesta-3,5-diène), solution dans de l'hexane, concentration d'environ 10 mg par 100 ml.

3.10 Gaz vecteur, pour la chromatographie: hélium ou hydrogène de pureté 99,9990 % (fraction massique).

3.11 Gaz auxiliaires, pour détecteur à ionisation de flamme: hydrogène de pureté 99,9990 % (fraction massique) et air purifié.

4 Appareillage

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

4.1 Ballon, de 250 ml de capacité, utilisable avec un réfrigérant à reflux.

4.2 Ampoules à décanter, de 500 ml de capacité.

4.3 Ballons à fond rond, de 100 ml de capacité.

4.4 Évaporateur rotatif.

¹⁾ Produit fourni par Merck, réf. 7734 ou similaire et réf. 7754 (pour le gel de silice extra pur 60). Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 15788 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

²⁾ Produit fourni par Sigma. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 15788 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

³⁾ Produit fourni par Chiron A.S., Heimdal, Norvège. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 15788 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4.5 Colonne en verre pour chromatographie, de 1,5 cm de diamètre intérieur sur 50 cm de longueur, avec robinet en téflon et tampon en fibres de laine de verre ou bien disque en verre fritté faisant office de fond.

Pour préparer la colonne remplie de gel de silice, y verser de l'hexane sur une hauteur de 5 cm environ, puis la remplir par petites portions d'un mélange de gel de silice dans de l'hexane (15 g pour 40 ml). Laisser reposer et terminer la préparation en agitant légèrement. Ajouter du sulfate de sodium anhydre (3.3) sur une hauteur d'environ 0,5 cm et éluer finalement avec de l'hexane en excès.

4.6 Chromatographe, pour chromatographie en phase gazeuse, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un injecteur diviseur ou «on column» et d'un four programmable à ± 1 °C près.

4.7 Colonnes capillaires en silice fondue, pour chromatographie en phase gazeuse, de 0,25 mm ou 0,32 mm de diamètre intérieur sur 25 m de longueur, revêtues d'une phase de phénylméthylsilicone à 5 % d'une épaisseur de film de 0,25 μm .

NOTE D'autres colonnes de polarité similaire ou inférieure peuvent également être utilisées.

4.8 Enregistreur-intégrateur, avec possibilité de mode d'intégration vallée à vallée.

4.9 Microseringue, à aiguille fixe, de 5 μl à 10 μl de capacité, pour chromatographie en phase gazeuse.

4.10 Manchon électrique chauffant, ou **plaque chauffante**.

5 Mode opératoire

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.1 Préparation de l'insaponifiable

5.1.1 Peser $20 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ d'huile dans un ballon de 250 ml (4.1). Ajouter 1 ml de solution étalon interne de 3,5-cholestadiène (3.7) (contenant 20 μg) et 75 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique (3.4). Monter un réfrigérant à reflux et chauffer jusqu'à légère ébullition pendant 30 min. Enlever le ballon contenant l'échantillon de la source de chaleur et laisser la solution refroidir lentement (ne pas laisser refroidir complètement sous peine de prise de l'échantillon). Ajouter 100 ml d'eau et transvaser la solution dans une ampoule à décanter (4.2) à l'aide de 100 ml d'hexane. Agiter le mélange vigoureusement pendant 30 s et le laisser se séparer.

Si une émulsion se produit qui ne disparaît pas rapidement, ajouter de l'éthanol par petites quantités.

5.1.2 Transférer la phase aqueuse inférieure dans une seconde ampoule à décanter et extraire de nouveau avec 100 ml d'hexane. Éliminer de nouveau la phase inférieure et laver trois fois les extraits d'hexane (combinés dans une autre ampoule à décanter), avec chaque fois 100 ml d'un mélange éthanol-eau [50 ml/100 ml (fraction volumique)] jusqu'à ce qu'on obtienne un pH neutre.

5.1.3 Passer la solution d'hexane à travers le sulfate de sodium anhydre (50 g), laver avec 20 ml d'hexane et faire évaporer dans un évaporateur rotatif (4.4) à 30 °C sous pression réduite jusqu'à siccité.

5.2 Séparation de la fraction de stérènes

5.2.1 Transférer le résidu dans la colonne de fractionnement à l'aide de deux prises d'hexane de 1 ml chacune; laisser l'échantillon s'écouler dans la colonne jusqu'à ce que le niveau de la solution atteigne le dessus de la couche de sulfate de sodium, puis démarrer l'élution chromatographique avec l'hexane à un débit d'environ 1 ml/min. Jeter la première fraction de 25 ml à 30 ml d'éluat et recueillir les 40 ml suivants. Transférer ensuite cette fraction dans un ballon à fond rond de 100 ml (4.3).

La première fraction renferme les hydrocarbures saturés [Figure 1a)] et la seconde les hydrocarbures stéroïdaux. La poursuite de l'élution donne du squalène et des composés connexes. Pour obtenir une bonne séparation entre les hydrocarbures saturés et les stérènes, il est nécessaire d'optimiser le volume des fractions. Pour ce faire, il convient d'ajuster le volume de la première fraction de telle sorte qu'à l'analyse de la seconde, les pics représentant les hydrocarbures saturés soient peu élevés [Figure 1c)]; si les pics n'apparaissent pas mais que l'intensité du pic étalon est faible, il convient de réduire le volume. Il est toutefois inutile de rechercher une séparation complète entre

les composés de la première fraction et de la seconde fraction, dans la mesure où il n'y a pas recouvrement des pics durant l'analyse chromatographique quand les conditions de chromatographie en phase gazeuse sont réglées de la manière indiquée en 5.3.1.

NOTE Il n'est en général pas nécessaire d'optimiser le volume de la seconde fraction du fait de la bonne séparation entre les autres composés. Néanmoins, la présence d'un grand pic à un niveau correspondant à un temps de rétention inférieur d'environ 1,5 min à celui de l'étalon est due à la présence de squalène, et est signe d'une mauvaise séparation.

5.2.2 Évaporer la seconde fraction dans un évaporateur rotatif (4.4) à 30 °C sous pression réduite jusqu'à sécheresse et dissoudre immédiatement le résidu dans 0,2 ml d'hexane. Conserver la solution au réfrigérateur jusqu'à l'analyse.

Il n'est pas nécessaire de conserver les résidus des étapes 5.1.3 et 5.2.2 au sec ou à température ambiante. Au contraire, dès qu'ils sont obtenus, y ajouter un solvant et conserver les solutions au réfrigérateur.

5.3 Chromatographie en phase gazeuse

5.3.1 Conditions de travail avec l'injecteur diviseur

Ces conditions sont comme suit:

- température de l'injecteur: 300 °C;
- température du détecteur: 320 °C;
- enregistreur-intégrateur: il convient de fixer les paramètres d'intégration de sorte à donner une évaluation correcte des aires; il est recommandé d'utiliser le mode d'intégration vallée à vallée;
- sensibilité: environ 16 fois l'atténuation minimale;
- quantité de solution injectée: 1 µl;
- températures de programmation du four: initialement 235 °C pendant 6 min, puis montée en température de 2 °C/min jusqu'à 285 °C;
- injecteur avec diviseur de débit 1:15;
- gaz vecteur: hélium ou hydrogène à une pression de 120 kPa et 85 kPa respectivement.

Ces conditions peuvent être réglées en fonction des caractéristiques de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse et de la colonne, de façon à obtenir des chromatogrammes respectant les exigences suivantes:

- pic de l'étalon interne à environ 5 min du temps indiqué en 5.3.2;
- pic de l'étalon interne à 80 % au moins de la valeur à pleine échelle.

Le système de chromatographie en phase gazeuse doit être contrôlé par injection d'un mélange de solution mère de 3,5-cholestadiène (3.6) et de solution de *n*-nonacosane (3.8). Le pic du 3,5-cholestadiène doit apparaître avant celui du *n*-nonacosane [Figure 1c)]. Si tel n'est pas le cas, deux mesures peuvent être prises: réduction de la température du four et/ou utilisation d'une colonne de polarité moindre.

5.3.2 Identification des pics

Si le gaz vecteur utilisé est de l'hélium, le pic de l'étalon interne apparaît après 19 min environ et le pic des stigmastadiènes après un temps de rétention relative d'environ 1,29 [Figure 1b)]. Si l'on utilise de l'hydrogène, le pic de l'étalon interne apparaît après 13 min environ et le pic des stigmastadiènes après un temps de rétention relative d'environ 1,35. Une valeur de référence pour les pics des stigmastadiènes peut être obtenue par analyse d'une solution de 3,5-stigmastadiène (3.9).

NOTE Si l'on ne dispose pas de 3,5-stigmastadiène (24-éthyl-cholesta-3,5-diène), il est possible d'obtenir une référence chromatographique pour les stigmastadiènes en analysant 1 g à 2 g d'une huile végétale raffinée. Les stigmastadiènes donnent un pic significatif et facilement identifiable.

Le pic des stigmastadiènes est un pic chromatographique isolé engendré par un mélange de 3,5-stigmastadiène et de très petites quantités de 2,4-isomère. Néanmoins, si la colonne a une polarité trop grande ou un pouvoir de résolution trop élevé, le 2,4-isomère risque d'apparaître comme un petit pic se situant à proximité de celui du 3,5-stigmastadiène et en avant de celui-ci (Figure 2). Pour garantir que les deux stigmastadiènes sont élués en même temps, il est conseillé de remplacer la colonne par une autre ayant une polarité moins élevée ou un diamètre intérieur supérieur.

6 Calcul

La teneur en stigmastadiènes, w , exprimée en milligrammes par kilogramme, est déterminée à l'aide de l'équation suivante:

$$w = \frac{A_s \times m_c}{A_c \times m_o}$$

où

A_s est l'aire du pic des stigmastadiènes (si le pic est divisé en deux, prendre la somme des aires des isomères 3,5 et 2,4);

A_c est l'aire de l'étalon interne (3,5-cholestadiène);

m_c est la masse d'étalon (3,5-cholestadiène) ajouté, en microgrammes;

m_o est la masse d'huile prélevée, en grammes.

Le facteur de réponse de la solution étalon interne de 3,5-cholestadiène est égal à 1 par rapport à celui des stigmastadiènes.

[ISO 15788-1:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10e4c918-e65b-4ee7-9556-83e17c395bd9/iso-15788-1-1999)

Le résultat doit être exprimé à deux décimales près.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10e4c918-e65b-4ee7-9556-83e17c395bd9/iso-15788-1-1999>