

---

---

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

**Partie 2:  
Méthode par chromatographie liquide  
à haute performance (CLHP)**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

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

*Part 2: Method using high-performance liquid chromatography (HPLC)*

ISO 15788-2:2003  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0e61508a-fb03-4dbb-87bc-c563008fcc43/iso-15788-2-2003>



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 15788-2:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0e6f308a-fb03-4dbb-87bc-c563008fcc43/iso-15788-2-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0e6f308a-fb03-4dbb-87bc-c563008fcc43/iso-15788-2-2003>

© ISO 2003

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
1     Domaine d'application .....	1
2     Références normatives .....	1
3     Termes et définitions .....	1
4     Principe .....	2
5     Réactifs .....	2
6     Appareillage .....	3
7     Échantillonnage .....	4
8     Préparation de l'échantillon pour essai .....	4
8.1   Généralités .....	4
8.2   Méthode avec étalon externe .....	4
8.3   Méthode avec étalon interne .....	5
9     Mode opératoire .....	5
9.1   Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	5
9.2   Identification des stéradiènes .....	5
10    Expression des résultats .....	6
10.1   Méthode avec étalon externe .....	6
10.2   Méthode avec étalon interne .....	6
11    Fidélité .....	7
11.1   Essai interlaboratoire .....	7
11.2   Répétabilité .....	7
11.3   Reproductibilité .....	7
12    Rapport d'essai .....	7
Annexe A (informative) Résultats de l'essai interlaboratoire .....	8
Annexe B (informative) Exemples de chromatogrammes .....	9
Bibliographie .....	10

## 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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 15788-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produit alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*. (standards.iteh.ai)

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 (Méthode de référence)*
- *Partie 2: Méthode par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)*

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

## Partie 2:

## Méthode par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 15788 spécifie une méthode pour le dosage des stéradiènes et plus précisément des stigmastadiènes. Les stéradiènes se forment par suite de la déshydratation des stérols pendant la décoloration mais également, et de façon partielle, pendant l'entraînement à la vapeur et la désodorisation. La méthode est également adaptée, en tant que méthode de sélection, pour détecter la présence d'huiles végétales raffinées dans les huiles vierges telles que l'huile d'olive vierge.

NOTE L'ISO 15788-1 constitue la méthode de référence pour le dosage des stigmastadiènes dans les huiles végétales, tandis que la présente partie de l'ISO 15788 peut être utilisée en tant que méthode de sélection rapide. En référence à la fidélité de la présente méthode (voir Annexe A), des échantillons d'huile d'olive vierge proches de la valeur limite adoptée par les règlements internationaux [Conseil oléicole international (COI), CE] peuvent être contrôlés par la méthode par chromatographie en phase gazeuse donnée dans l'ISO 15788-1.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0e6f308a-fb03-4dbb-87bc-c563008fcc43/iso-15788-2-2003>

### 2 Références normatives

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0e6f308a-fb03-4dbb-87bc-c563008fcc43/iso-15788-2-2003>

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

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

ISO 12228, *Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la teneur en stérols individuels et totaux — Méthode par chromatographie en phase gazeuse*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

#### 3.1

##### **teneur en stigmastadiènes**

partie des stigmastadiènes séparés par chromatographie en phase liquide dans les conditions spécifiées par la présente méthode

NOTE Elle est exprimée en milligrammes par kilogramme.

#### 3.2

##### **teneur en stéradiènes**

partie de tous les stéradiènes séparés par chromatographie en phase liquide dans les conditions spécifiées par la présente méthode

NOTE Elle est exprimée en milligrammes par kilogramme.

## 4 Principe

Séparation des stéradiènes, sous forme de composés lipidiques non polaires, de la majeure partie des autres lipides, à l'aide d'éther de pétrole sur une colonne remplie de gel de silice. Concentration de l'éluat d'éther de pétrole et analyse par chromatographie liquide à haute performance sur silice greffée C 18 et détection UV à 235 nm. La quantification dépend du type d'échantillon et est effectuée avec un étalon interne ou externe.

## 5 Réactifs

**AVERTISSEMENT — L'attention est attirée sur la réglementation relative à la manipulation des substances dangereuses. Des mesures s'imposent en matière de technique, d'organisation et de sécurité des personnes.**

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

**5.1 Eau**, conforme à la qualité au moins 1 de l'ISO 3696:1987.

**5.2 Gel de silice 60**, pour chromatographie sur colonne, de granulométrie 0,063 mm à 0,200 mm, ou 0,063 mm à 0,100 mm<sup>1)</sup>, et de teneur en eau égale à 2 g pour 100 g.

Sécher le gel de silice dans une coupelle en porcelaine pendant 12 h dans une étuve à 160 °C, puis refroidir à température ambiante dans un dessiccateur. Pour obtenir un gel de silice avec une teneur en eau de 2 g pour 100 g, peser, à 1 g près, 98 g de gel de silice séché dans une fiole conique à bouchon en verre rodé et ajouter 2 g d'eau (pesé à 0,01 g près). Agiter vigoureusement pendant 1 min et laisser le gel de silice reposer une nuit entière dans un récipient étanche.

**5.3 Éther de pétrole**, ayant un point d'ébullition compris entre 40 °C et 60 °C.

**5.4 Acétonitrile**, de qualité pour chromatographie. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0e6f308a-fb03-4dbb-87bc-55630085-13/iso-15788-2-2003>

**5.5 *tert*-Butyle méthyle oxyde**, de qualité pour chromatographie.

**5.6 Isooctane** (triméthyl-2,2,4 pentane).

**5.7 Cholesta-3,5-diène<sup>2)</sup>**, de pureté connue au moins égale à 95 g pour 100 g.

Vérifier la pureté de l'étalon de cholestadiène par chromatographie en phase gazeuse en utilisant comme étalon interne du 5 $\alpha$ -cholestane. Pour cet essai, voir les conditions de la méthode chromatographique en phase gazeuse pour le dosage des stérols spécifiée dans l'ISO 12228. Le facteur de réponse du détecteur à ionisation de flamme est supposé égal à 1,0. Tenir compte de la teneur obtenue lors du dosage des stéradiènes.

### 5.8 Solutions mères et solutions étalons

**5.8.1 Solution mère de cholesta-3,5-diène**, ayant une concentration de 1 mg/ml.

Peser, à 0,1 mg près, 50,0 mg de cholesta-3,5-diène dans une fiole jaugée de 50 ml. Mettre en solution et compléter au trait repère avec du *tert*-butyle méthyle oxyde (5.5).

1) Par exemple, n° 7734 ou 15101 distribué par E. Merck, 64271 Darmstadt, Allemagne.

2) Par exemple, n° C 6012 distribué par Sigma Chemie GmbH, Grünwalder Weg 30, 82041 Deisenhofen, Allemagne.

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.

## 5.8.2 Solution étalon de cholesta-3,5-diène pour CLHP

### 5.8.2.1 Solution étalon externe, ayant une concentration de 10 µg/ml.

Verser à la pipette 100 µl de la solution mère de cholesta-3,5-diène (5.8.1) dans une fiole jaugée de 10 ml et compléter au trait repère avec un mélange de *tert*-butyle méthyle oxyde et d'acétonitrile (5.8.4).

Une portion aliquote de 20 µl de cette solution contient 0,20 µg et est injectée dans la colonne CLHP. La concentration de la solution étalon dépend de la nature de l'huile à analyser. En cas d'huiles vierges dont la teneur en stigmastadiènes est inférieure à 0,5 mg/kg, la concentration de la solution étalon externe doit être de 0,2 µg/ml.

### 5.8.2.2 Solution étalon interne, ayant une concentration de 2 µg/ml.

Verser à la pipette 100 µl de la solution mère de cholesta-3,5-diène (5.8.1) dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter au trait repère avec de l'éther de pétrole (5.3).

La concentration de la solution étalon dépend de la nature de l'huile à analyser. Dans le cas d'huiles vierges dont la teneur en stigmastadiènes est inférieure à 0,5 mg/kg, la concentration de la solution étalon interne doit être de 0,2 µg/ml.

## 5.8.3 Solution étalon de 5α-cholestane pour CPG, ayant une concentration de 1 mg/ml.

Peser, à 0,1 mg près, 50,0 mg de 5α-cholestane<sup>3)</sup> dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter au trait repère avec de l'isooctane (5.6). Utiliser cette solution pour déterminer la pureté de l'étalon de cholesta-3,5-diène (5.8.2) comme suit.

Verser à la pipette 1 ml de solution étalon de 5α-cholestane et 1 ml de solution mère de cholesta-3,5-diène (5.8.1) dans une fiole jaugée de 10 ml (injection par diviseur) ou dans une fiole jaugée de 50 ml (injection sur colonne) et compléter au trait repère avec de l'isooctane.

## 5.8.4 Mélange de *tert*-butyle méthyle oxyde et d'acétonitrile, [50:50 (en volume)].

**5.8.5 Phase mobile pour CLHP:** mélange de *tert*-butyle méthyle oxyde et d'acétonitrile, [70:30 (en volume)], dégazé.

**5.9 Cholestane**, de pureté connue au moins égale à 95 g pour 100 g.

## 6 Appareillage

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

### 6.1 Ouate ou laine de verre.

La ouate peut être dégraissée par extraction pendant 8 h avec de l'éther de pétrole.

**6.2 Colonne chromatographique**, en verre, de 10 mm de diamètre intérieur et de 150 mm de longueur, avec un réservoir de 25 ml.

**6.3 Fioles de forme conique**, de 25 ml de capacité.

**6.4 Fioles jaugées**, de 5 ml, 10 ml et 50 ml de capacité.

3) Par exemple, n° C 8003 distribué par Sigma Chemie GmbH, Grünwalder Weg 30, 82041 Deisenhofen, Allemagne.

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.

**6.5 Béchers**, de différentes tailles.

**6.6 Système de CLHP**, constitué d'une pompe, d'un dispositif d'injection de l'échantillon (boucle de 20 µl et 100 µl), d'un détecteur UV pour mesurages à 235 nm et d'un système d'intégration.

**6.7 Colonne de CLHP**, de 250 mm de longueur, de 4,0 mm ou 4,6 mm de diamètre intérieur, avec remplissage en phase inverse de type silice greffée C 18, de 5 µm<sup>4</sup>) de granulométrie.

**6.8 Échantillonneur automatique**, de capacité appropriée.

**6.9 Évaporateur rotatif**, avec bain d'eau.

## 7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, n'ayant pas été endommagé ou modifié pendant le transport ou l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 15788. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 5555.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

### 8.1 Généralités

Avant l'analyse, et si nécessaire, éliminer l'eau de l'échantillon de corps gras, en chauffant brièvement à 100 °C environ 5 g de l'échantillon et en centrifugeant.

Boucher l'extrémité de la colonne chromatographique avec un petit morceau de ouate (6.1).

Ajouter dans la colonne 5 g de gel de silice (5.2) sans solvant et tasser en tapotant doucement la colonne sur une planche en bois.

### 8.2 Méthode avec étalon externe

Peser, à 1 mg près, environ 500 mg d'échantillon dans un petit bécher. Les mettre en solution dans 2 ml d'éther de pétrole et verser la solution dans la colonne, le robinet étant ouvert. Rincer le bécher à deux reprises avec, à chaque fois, 2 ml d'éther de pétrole.

Dès que le solvant atteint le haut du garnissage de la colonne, éluer les substances non polaires avec 20 ml d'éther de pétrole et recueillir l'éluat dans une fiole de forme conique (6.3).

Évaporer le solvant jusqu'à siccité totale sur un évaporateur rotatif et mettre le résidu en solution dans environ 500 µl de mélange de *tert*-butyle méthyle oxyde et d'acétonitrile (5.8.4).

---

4) Par exemple Supersphere 100, silice greffée C 18 avec bouchon, n° 1.16858 distribué par E. Merck, 64271 Darmstadt, Allemagne.

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.



### 8.3 Méthode avec étalon interne

Lors de l'utilisation de cette méthode, s'assurer que l'échantillon ne contient pas de petites quantités de cholesta-3,5-diène (par exemple, des huiles raffinées).

Peser, à 1 mg près, environ 500 mg d'échantillon dans un petit bécher. Ajouter 1,0 ml de solution d'étalon interne de cholesta-3,5-diène. Les mettre en solution dans 2 ml d'éther de pétrole et verser le tout dans la colonne, le robinet étant ouvert. Rincer le bécher à deux reprises avec, à chaque fois, 2 ml d'éther de pétrole.

Dès que le solvant atteint le haut du garnissage de la colonne, éluer les substances non polaires avec 20 ml d'éther de pétrole et recueillir l'éluat dans une fiole de forme conique (6.3).

Évaporer le solvant jusqu'à siccité totale sur un évaporateur rotatif et mettre le résidu en solution dans environ 500 µl de mélange de *tert*-butyle méthyle oxyde et d'acétonitrile (5.8.4).

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Les conditions suivantes se sont révélées appropriées:

phase stationnaire: silice greffée C 18, 5 µm;  
 dimensions de la colonne: 250 mm × 4,6 mm;  
 phase mobile: mélange de *tert*-butyle méthyle oxyde et d'acétonitrile (5.8.5);  
 débit: 1 ml/min;  
 volume injecté: 20 µl à 100 µl (suivant la concentration supposée);  
 détection: UV, 235 nm.

### 9.2 Identification des stéradiènes

Procéder à l'identification et à la localisation des pics en fonction des temps de rétention relatifs donnés dans le Tableau 1 (voir également les chromatogrammes à l'Annexe B). Prendre le cholestadiène, qui est élué après 20 min à 25 min, comme substance de référence.

**Tableau 1 — Temps de rétention relatifs pour les produits dérivés des stérols**

Produits dérivés des stérols	Temps de rétention relatifs
Cholestadiène	1,00
Stigmastatriène	1,05
Campestadiène	1,07
Stigmastadiène	1,15

NOTE Selon l'huile ou le corps gras analysé, il faut s'attendre à trouver d'autres stéradiènes ou stératriènes. Une identification des pics peut se faire par injection d'un échantillon d'huile ou de corps gras raffiné ou à partir d'un étalon de stigmastadiène qu'on aura fait soi-même. Dans les conditions chromatographiques indiquées, le chromatogramme d'une huile vierge (non décolorée) ne montre aucun pic dans la région où les stéradiènes sont censés se trouver.