

---

---

**Huiles essentielles de bergamote, de citron,  
de bigarade et de limette complètement ou  
partiellement privées de bergaptène —  
Détermination de la teneur en bergaptène  
par chromatographie liquide à haute  
pression (CLHP)**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Oils of bergamot, lemon, citron and lime, fully or partially reduced in  
bergapten — Determination of bergapten content by high-pressure liquid  
chromatography (HPLC)*

[ISO 7358:2002](https://standards.iso.org/iso/7358:2002)

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002>



**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 7358:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002>

© ISO 2002

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.ch](mailto:copyright@iso.ch)  
Web [www.iso.ch](http://www.iso.ch)

Imprimé en Suisse

## 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.

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 de la présente Norme internationale 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 7358 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 54, *Huiles essentielles*.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

ISO 7358:2002

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002>

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

ISO 7358:2002

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002>

# Huiles essentielles de bergamote, de citron, de bigarade et de limette complètement ou partiellement privées de bergaptène — Détermination de la teneur en bergaptène par chromatographie liquide à haute pression (CLHP)

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode d'analyse par chromatographie liquide sous pression, avec utilisation soit d'un étalon interne, soit d'un étalon externe, pour la détermination de la teneur en bergaptène des huiles essentielles de bergamote [*Citrus aurantium* ssp. *bergamia* (Risso et Poit.) Wight et Arn. ex Engl.], de citron [*Citrus limon* (L.) Burm. f.], de bigarade (*Citrus bigaradia* Risso) et de limette [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle et *Citrus latifolia* Tanaka], complètement ou partiellement privées de bergaptène.

La méthode de l'étalon interne est applicable aux huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène supérieure ou égale à une fraction massique de 0,001 %.

La méthode de l'étalon externe est applicable aux huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène correspondant à une fraction massique comprise entre 0,000 1 % et 0,001 %.

## 2 Références normatives

[ISO 7358:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002>

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 356, *Huiles essentielles — Préparation des échantillons pour essai*

ISO 8432:1987, *Huiles essentielles — Analyse par chromatographie liquide sous pression — Méthode générale*

## 3 Principe

La chromatographie liquide est basée sur des phénomènes physico-chimiques d'adsorption, de partage, d'échange d'ions ou d'exclusion. Elle permet l'analyse de petites quantités d'huiles essentielles sur une colonne de chromatographie avec un remplissage adéquat, dans des conditions appropriées, la localisation des différents constituants et la détermination quantitative des composés spécifiques.

## 4 Réactifs

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

**DANGER — L'attention est attirée sur les risques dérivant de l'emploi spécifié du chloroforme, qui est un solvant toxique.**

**4.1 Substance de référence: bergaptène**, de pureté connue  $\geq 95$  %.

**4.2 Étalon interne: coumarine**, de pureté connue  $\geq 98$  %.

**4.3 Solvants.**

**4.3.1 Chloroforme**, de pureté analytique, contenant moins de 2 % (fraction volumique) d'éthanol, à utiliser lors de la préparation de l'échantillon d'huile essentielle contenant du bergaptène, l'étalon interne et la phase mobile.

**4.3.2 Hexane**, de qualité CLHP, à utiliser dans la phase mobile (4.3.4).

**4.3.3 Acétate d'éthyle**, de qualité CLHP, à utiliser dans la phase mobile (4.3.4).

**4.3.4 Phase mobile.**

Les solvants utilisés pour la phase mobile doivent être de qualité compatible avec le système de détection utilisé, et préparés en quantité suffisante pour l'ensemble de l'analyse. Préparer, à titre indicatif, un des mélanges suivants:

**4.3.4.1 Hexane** (4.3.2) et **acétate d'éthyle** (4.3.3), mélangés dans un rapport volumique de 80:20.

**4.3.4.2 Hexane** (4.3.2) et **chloroforme** (4.3.1), mélangés dans un rapport volumique de 85:15.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5a9dbcbb-05d9-401b-8dc0-3d03b44f2e38/iso-7358-2002>

## 5 Appareillage

**5.1 Système de CLHP**, composé des éléments suivants.

**5.1.1 Chromatographe pour phase liquide.**

**5.1.2 Colonne**, en acier inoxydable, d'une longueur comprise entre 150 mm et 250 mm, de diamètre intérieur compris entre 4 mm et 5 mm et garnie d'une phase stationnaire de silice granulée de qualité CLHP, présentant une granulométrie voisine de 5  $\mu\text{m}$ .

**5.1.3 Système délivrant le solvant**, permettant de délivrer la phase mobile à un débit constant ou programmé.

**5.1.4 Système de dégazage des solvants** (facultatif).

**5.1.5 Détecteur à UV**, pouvant être réglé à une longueur d'onde de 254 nm ou de 313 nm.

**5.1.6 Enregistreur et intégrateur** (facultatif), compatibles avec l'ensemble du système de CLHP.

**5.2 Fioles jaugées**, de 15 ml à 150 ml de capacité, selon les quantités supposées de bergaptène contenues dans l'échantillon.

## 6 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 356.

Dissoudre les éventuels dépôts solides en les chauffant modérément.

## 7 Mode opératoire

### 7.1 Conditions opératoires pour la CLHP

Régler le débit de la phase mobile (4.3.4) de façon que les pics correspondant au bergaptène et à la coumarine soient nettement séparés des autres constituants de l'huile essentielle détectables par le détecteur à UV (5.1.5). Typiquement, le débit se situe entre 0,5 ml/min et 1 ml/min.

Suivre le mode opératoire spécifié dans l'ISO 8432.

### 7.2 Détermination

#### 7.2.1 Méthode de l'étalon interne appliquée aux huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène $\geq 0,001$ % (fraction massique)

##### 7.2.1.1 Optimisation des conditions chromatographiques pour CLHP

###### 7.2.1.1.1 Séparation

Vérifier sur les chromatogrammes obtenus que le bergaptène est bien séparé des autres constituants de l'huile essentielle. Vérifier en outre que la coumarine utilisée comme étalon interne (4.2) ne masque pas, ni ne coïncide avec, un quelconque constituant de l'huile essentielle. Déterminer les temps de rétention du bergaptène et de la coumarine.

###### 7.2.1.1.2 Quantité d'étalon interne

La quantité de coumarine (étalon interne) ajoutée à l'échantillon est considérée comme adéquate lorsque les aires de pic du bergaptène (dans l'huile essentielle) et de la coumarine sont approximativement égales sur les chromatogrammes. Pour déterminer cette quantité, injecter dans le CLHP une solution (par exemple 10  $\mu$ l) contenant une quantité connue (par exemple 10 mg) de coumarine (4.2) dissoute dans du chloroforme (4.3.1, par exemple 10 ml). Ensuite, injecter le même volume d'une solution de l'huile essentielle à doser dissoute dans du chloroforme. Ajuster la concentration en masse de ces deux solutions de manière à obtenir des aires de pic comparables.

###### 7.2.1.2 Coefficient de réponse $K$

Préparer une solution d'étalonnage comme suit. Dans une fiole jaugée (5.2) de capacité appropriée, peser, à 0,1 mg près, environ 20 mg de coumarine (4.2). Dans la même fiole jaugée, peser, à 0,1 mg près, environ 10 mg de bergaptène (4.1), puis dissoudre les deux composés dans environ 20 ml de chloroforme (4.3.1).

Injecter une quantité adéquate (voir 7.2.1.1) de la solution d'étalonnage de façon à rester dans les limites de la gamme de sensibilité du détecteur.

Mesurer les aires des pics. Un chromatogramme type de composés de référence est donné dans l'annexe A.

Calculer le coefficient de réponse  $K$  à l'aide de l'équation (1):

$$K = \frac{m_R \cdot A_{IS}}{m_{IS} \cdot A_R} \quad (1)$$

où

$m_R$  est la masse, en milligrammes, du bergaptène (substance de référence) (4.1) ajouté à la solution;

$m_{IS}$  est la masse, en milligrammes, de la coumarine (étalon interne) (4.2) ajoutée à la solution;

## ISO 7358:2002(F)

$A_R$  est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant au bergaptène (substance de référence) (4.1);

$A_{IS}$  est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la coumarine (étalon interne) (4.2).

NOTE Dans l'ISO 8432:1987, cette équation équivaut à la présentation suivante:

$$K = \frac{m_R A_E}{m_E A_R}$$

où

$m_R$  est la masse, en milligrammes, du bergaptène (substance de référence) (4.1) ajouté à la solution;

$m_E$  est la masse, en milligrammes, de la coumarine (étalon interne) (4.2) ajoutée à la solution;

$A_R$  est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant au bergaptène (substance de référence) (4.1);

$A_E$  est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la coumarine (étalon interne) (4.2).

### 7.2.1.3 Dosage du bergaptène

Dans une fiole jaugée (5.2) de capacité appropriée (par exemple 15 ml), préparer la solution pour essai comme suit. Peser, à 0,1 mg près, une quantité adéquate de coumarine ( $m_{IS}$ ) (environ 10 mg), comme déterminée en 7.2.1.2, et une quantité d'huile essentielle ( $m_S$ ), de façon à obtenir un chromatogramme dans lequel l'aire du pic correspondant au bergaptène est sensiblement égale à celle correspondant au pic de la coumarine.

Ajouter du chloroforme (4.3.1) (environ 8 ml) et agiter soigneusement pour dissoudre la coumarine.

La teneur en bergaptène des huiles essentielles varie d'un échantillon à l'autre, selon qu'il est complètement ou partiellement privé de bergaptène. Par conséquent, il peut quelquefois être nécessaire de préparer plusieurs dilutions de la solution pour essai, de façon que les aires des pics du bergaptène et de la coumarine soient sensiblement égales. De ce fait, pour le dosage, choisir la dilution la plus appropriée répondant à cette exigence.

Dans les mêmes conditions opératoires que celles établies en 7.2.1.1, injecter une quantité adéquate de la solution pour essai de façon à rester dans les limites de la gamme de sensibilité du détecteur.

Mesurer et consigner les aires des pics correspondant au bergaptène ( $A_x$ ) et à la coumarine ( $A_{IS}$ ).

Un chromatogramme type de composés de référence est donné dans l'annexe A.

### 7.2.2 Méthode de l'étalon externe appliquée aux huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène comprise entre 0,000 1 % et 0,001 % (fraction massique)

Suivre le mode opératoire spécifié dans l'ISO 8432 relatif à la méthode de l'étalon externe.

## 8 Calculs

### 8.1 Méthode de l'étalon interne appliquée aux huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène $\geq 0,001$ % (fraction massique)

À l'aide de l'équation (2) et en utilisant le coefficient de réponse  $K$  déterminé en 7.2.1.2, calculer la fraction massique,  $w_x$ , exprimée en pourcentage, du bergaptène présent dans l'huile essentielle.

$$w_x = K \left( \frac{m_{IS} \cdot A_x}{m_S \cdot A_{IS}} \right) \times 100 \% \quad (2)$$

où

$K$  est le coefficient de réponse calculé selon l'équation (1) (voir 7.2.1.2);

$m_{IS}$  est la masse, en milligrammes, de la coumarine (étalon interne) ajoutée à l'échantillon pour essai (voir 7.2.1.3);

$m_S$  est la masse, en milligrammes, de l'huile essentielle dans l'échantillon pour essai (voir 7.2.1.3);

$A_x$  est l'aire de pic, en unités d'intégrateur, correspondant au bergaptène dans l'échantillon pour essai (voir 7.2.1.3);

$A_{IS}$  est l'aire de pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la coumarine (étalon interne) (voir 7.2.1.3).

NOTE En 10.1 de l'ISO 8432:1987, la fraction massique,  $c_x$ , exprimée en pourcentage, du bergaptène présent dans l'huile essentielle équivaut à l'équation (2) sous la présentation suivante:

$$c_x = \frac{A_x m_E K}{A_E m_x} \times 100 \%$$

où

$A_x$  est l'aire de pic, en unités d'intégrateur, correspondant au bergaptène dans l'échantillon pour essai (voir 7.2.1.3);

$A_E$  est l'aire de pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la coumarine (étalon interne) (voir 7.2.1.3);

$m_x$  est la masse, en milligrammes, de l'huile essentielle dans l'échantillon pour essai (voir 7.2.1.3);

$m_E$  est la masse, en milligrammes, de la coumarine (étalon interne) ajoutée à l'échantillon pour essai (voir 7.2.1.3);

$K$  est le coefficient de réponse calculé selon l'équation (1) (voir 7.2.1.2);

## 8.2 Méthode de l'étalon externe appliquée aux huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène comprise entre 0,000 1 % et 0,001 % (fraction massique)

Calculer la teneur en bergaptène conformément à l'ISO 8432.

## 9 Fidélité

### 9.1 Répétabilité — Huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène $\geq 0,001$ % (fraction massique)

Pour  $K$  et pour l'expression des résultats (%), prendre la valeur moyenne de plusieurs essais (trois au minimum) effectués sur le même échantillon. Les différentes valeurs ( $K$  ou %) prises en considération pour effectuer cette moyenne ne doivent pas s'écarter au-delà de  $\pm 5$  %.

### 9.2 Répétabilité — Huiles essentielles ayant une teneur en bergaptène comprise entre 0,000 1 % et 0,001 % (fraction massique)

Prendre la valeur moyenne de plusieurs essais (trois au minimum) effectués sur le même échantillon. Les valeurs prises en considération pour effectuer cette moyenne ne doivent pas s'écarter au-delà de  $\pm 20$  %.