

---

---

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

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

[ISO 15302:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-  
f207adcc07de/iso-15302-2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007)



**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 15302:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2007

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)

Version française parue en 2009

Publié 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 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 15302 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 15302:1998).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007>

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

ISO 15302:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007>

# Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination du 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 à l'aide d'une détection fluorimétrique, dans la gamme de 0,1 µg/kg à 50 µg/kg.

## 2 Références normatives

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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 661, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation de l'échantillon pour essai*

## 3 Termes et définitions

[ISO 15302:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007)

[f207adcc07de/iso-15302-2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007)

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

### 3.1

#### teneur en benzo[a]pyrène

fraction massique de benzo[a]pyrène dans la prise d'essai, déterminée par la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

NOTE La teneur est exprimée en microgrammes par kilogramme.

## 4 Principe

Une prise d'essai est dissoute dans de l'éther de pétrole et du benzo[b]chrysène est ajouté en tant qu'étalon interne. Une quantité appropriée d'échantillon est adsorbée sur une colonne d'alumine puis éluée avec de l'éther de pétrole afin d'éliminer toute présence de benzo[a]pyrène.

## 5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, sauf spécification contraire. 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.

**PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ — L'attention est attirée sur les réglementations qui spécifient les règles relatives à la manipulation des substances dangereuses. Il convient que les utilisateurs connaissent les mesures de sécurité relatives au personnel, à la technique et à l'organisation, et qu'ils s'y conforment.**

**5.1 Eau**, ayant fait l'objet d'une double distillation, filtrée à travers une membrane filtrante de 0,45 µm de taille de pores. Il est également possible d'utiliser de l'eau déionisée obtenue à partir de systèmes de déminéralisation d'eau.

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

**5.3 Acétonitrile**, pour CLHP.

**5.4 Tétrahydrofurane**, pour CLHP.

**5.5 Mélange acétonitrile-tétrahydrofurane**, préparé en mélangeant 90 ml d'acétonitrile (5.3) et 10 ml de tétrahydrofurane (5.4).

**5.6 Toluène**, pour CLHP.

**5.7 Sulfate de sodium**, anhydre, en grains.

**5.8 Alumine, degré d'activité 4**, préparée à partir d'oxyde d'aluminium neutre, degré d'activité supérieure à 1<sup>1)</sup>, désactivée par l'ajout de 10 ml d'eau (5.1) à 90 g d'alumine.

Étant donné les différences d'activité des différentes marques d'alumine, il est recommandé d'effectuer un contrôle afin de confirmer que le mode opératoire de désactivation est approprié à la récupération totale du benzo[a]pyrène à partir d'un échantillon de référence.

**ATTENTION — LA RÉACTION DE DÉSACTIVATION EST EXOTHERMIQUE ET IL PEUT Y AVOIR ACCUMULATION DE PRESSION.**

(standards.iteh.ai)

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

**5.9 Benzo[a]pyrène<sup>2)</sup>**, pur à 99,0 % en masse.

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

**5.9.1 Solution mère de benzo[a]pyrène** dans du toluène, 0,5 mg/ml.

Peser, à 0,1 mg près, environ 12,5 mg de benzo[a]pyrène dans une fiole jaugée de 25 ml. Le dissoudre dans le toluène (5.6) et remplir jusqu'au trait avec ce solvant.

Conserver la solution dans l'obscurité à 4 °C où elle reste stable pendant au moins 6 mois.

**5.9.2 Solutions étalons de benzo[a]pyrène.**

Préparer deux solutions étalons contenant respectivement, environ 0,2 µg/ml et 0,01 µg/ml de benzo[a]pyrène, en diluant les parties aliquotes de la solution mère (5.9.1) avec de l'acétonitrile.

---

1) «L'oxyde d'aluminium 90 activé neutre» 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. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

2) Un matériau de référence approprié est disponible auprès du Centre commun de recherche (JRC) de la Commission Européenne, Institut des matériaux et mesures de référence (IRMM). 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.

### 5.10 Solution étalon interne de benzo[b]chrysène<sup>3)</sup> dans de l'acétonitrile.

Préparer une solution mère contenant, au nanogramme près, environ 10 ng/μl. Diluer la solution 10 fois dans une fiole jaugée afin d'obtenir une solution étalon interne avec une concentration d'environ 1 ng/μl.

NOTE Il est également possible de préparer cette solution en dissolvant 99,0 % en masse de benzo[b]chrysène<sup>3)</sup>, dans de l'acétonitrile.

## 6 Appareillage

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

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

**6.2 Bains-marie**, l'un maintenu à  $(35 \pm 2)$  °C et l'autre à  $(65 \pm 2)$  °C.

**6.3 Évaporateur rotatif**, il est possible d'utiliser un évaporateur rotatif sous vide et un bain-marie réglé à 40 °C. Il convient de veiller à empêcher toute contamination croisée. Nettoyer soigneusement le système entre les déterminations.

**6.4 Chromatographie liquide à haute performance**, comprenant une pompe CLHP, une vanne d'injection avec une boucle d'échantillonnage de 50 μl, une colonne à polarité de phase inversée, un intégrateur électronique et un enregistreur de diagramme.

Si un échantillonneur automatique est utilisé, la boucle d'échantillonnage doit être rincée à l'acétonitrile entre les injections consécutives.

**6.5 Colonnes d'analyse CLHP.**

**6.5.1 Colonne de garde à polarité de phase inversée**, pouvant séparer le benzo[a]pyrène des co-extraits, ainsi qu'une précolonne appropriée [par exemple, en acier inoxydable, de 75 mm de longueur et de 4,6 mm de diamètre intérieur, garnie de Lichrosorb RP-18 (granulométrie de 5 μm)]<sup>4)</sup>.

**6.5.2 Colonne CLHP à polarité de phase inversée**, de 250 mm de longueur et de 4,6 mm de diamètre intérieur (acier inoxydable), pour hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) [par exemple, Chromspher 5 PAH ou Vydac 201 TP5]<sup>4)</sup>.

**6.6 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.

**6.7 Mini-flacons à bords sertis**, d'un volume d'environ 1 ml, munis de septums recouverts d'une couche de PTFE et de bouchons en aluminium.

**6.8 Sertisseuse manuelle**, permettant de sertir les bouchons sur les flacons.

**6.9 Pipettes jetables.**

3) Un matériau de référence approprié est disponible auprès du Centre commun de recherche (JRC) de la Commission Européenne, Institut des matériaux et mesures de référence (IRMM) ou de Dr. Ehrenstorfer GmbH. 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.

4) 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 du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

## 7 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire. Il convient qu'il n'ait été ni endommagé ni modifié au cours du transport ou du stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est fournie dans l'ISO 5555<sup>[1]</sup>.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

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

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Récupération de l'échantillon

**9.1.1** Peser, à 0,001 g près, environ 0,400 g de corps gras dans un bécher en verre et le dissoudre dans 2 ml d'éther de pétrole (5.2). Ajouter 20 µl de la solution étalon interne (5.10) à l'aide d'une microsiringue. Cela équivaut à 50 µg/kg lorsque le calcul porte sur la masse de l'échantillon. Si l'on attend un niveau élevé de benzo[a]pyrène, ajouter 50 µl de la solution étalon interne (5.10). Cela équivaut à 125 µg/kg lorsque le calcul porte sur la masse de l'échantillon.

**9.1.2** Remplir la colonne de chromatographie (6.1), jusqu'à mi-hauteur, d'éther de pétrole (5.2). Peser rapidement 22 g d'alumine (5.8) dans un petit bécher, les transvaser immédiatement dans la colonne, puis tapoter délicatement la colonne afin d'accélérer la décantation de l'alumine.

**9.1.3** Ajouter du sulfate de sodium anhydre (5.7) jusqu'en haut de la colonne afin de constituer une couche d'environ 30 mm d'épaisseur.

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

**9.1.5** Placer une fiole jaugée de 20 ml sous la colonne.

**9.1.6** Introduire la solution de corps gras (9.1.1) dans la colonne. Rincer la colonne en utilisant des quantités minimales d'éther de pétrole (5.2), en laissant la couche de solvant pénétrer dans la couche de sulfate de sodium entre les rinçages.

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

**9.1.8** Évaporer le solvant de l'éluat dans le bain-marie réglé à 65 °C, jusqu'à un volume d'environ 0,5 ml à 1 ml, puis transvaser la solution concentrée dans un mini-flacon à bords sertis (6.7), préalablement pesé à 0,1 mg près.

**9.1.9** Poursuivre l'évaporation à partir du mini-flacon dans le bain-marie (5.1) 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 mini-flacon, en poursuivant l'évaporation sous azote. Répéter le rinçage et transvaser une nouvelle fois dans le mini-flacon.

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

**9.1.11** Peser le mini-flacon à 0,1 mg près et calculer la masse du résidu. Boucher le mini-flacon avec le septum recouvert de PTFE et le bouchon en aluminium et conserver à 4 °C.



## 9.2 Chromatographie liquide à haute performance

**9.2.1** Utiliser un mélange de 880 ml d'acétonitrile (5.3) et de 120 ml d'eau (5.1) comme solvant d'élution. Dégazer le solvant d'élution 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.

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

**9.2.3 Courbe d'étalonnage et détermination du facteur de réponse relative:** préparer cinq dilutions des solutions étalons de benzo[a]pyrène (5.9.2) de manière que l'injection de 50 µl de chacune d'elles donne des relevés correspondant à 0,01 ng, 0,04 ng, 0,2 ng, 1,0 ng et 2,0 ng de benzo[a]pyrène. Ajouter 0,5 ng d'étalon interne aux solutions étalons. À partir de ces relevés, établir une courbe d'étalonnage à cinq points en utilisant les surfaces des pics de l'intégrateur et de l'enregistreur de diagramme. Ces étalonnages sont également utilisés pour le calcul du facteur de réponse relatif (10.1), entre le benzo[a]pyrène et l'étalon interne.

## 9.3 Analyse de l'échantillon

**9.3.1** Injecter 250 µl du mélange acétonitrile-tétrahydrofurane (5.5) dans le mini-flacon contenant le résidu épuré (9.1.11). Dissoudre le résidu en remuant avec précaution et en évitant tout contact du solvant avec le septum.

Des niveaux de benzo[a]pyrène compris entre 0,1 µg/kg et 50 µg/kg peuvent être déterminés à l'aide de la courbe d'étalonnage (9.2.3). Pour les concentrations supérieures à 10 µg/kg, il convient de diluer la solution de résidu (9.3.2) une nouvelle fois avec le mélange acétonitrile-tétrahydrofurane (5.5), ou d'injecter un volume inférieur à 50 µl (9.3.2).

**9.3.2** Injecter, dans la colonne CLHP, un volume connu avec exactitude d'environ 50 µl de résidu dissous et lancer le chromatogramme. Il convient de s'assurer que pas plus de 1,5 mg de résidu n'est introduit dans la colonne. Si une quantité plus importante de résidu est présente, la quantité de tétrahydrofurane (5.4) doit être ajustée ou l'étape de récupération de l'échantillon doit être répétée.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007>