

---

---

**Corps gras d'origine végétale —  
Détermination de la teneur en  
phospholipides dans les lécithines par  
CLHP avec détecteur à diffusion de la  
lumière**

*Vegetable fats and oils — Determination of phospholipids content in  
lecithins by HPLC using a light-scattering detector*

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

ISO 11701:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee09-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>



**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 11701:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee09-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee09-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2009

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

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>2</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>3</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>3</b>
<b>10</b> <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	<b>5</b>
<b>11</b> <b>Fidélité de la méthode</b> .....	<b>5</b>
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>6</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Chromatogramme de CLHP</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Résultats d'un essai interlaboratoires</b> .....	<b>8</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>11</b>

iTech STANDARD PREVIEW  
 (standards.iteh.ai)  
 ISO 11701:2009  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee19-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>

## 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 11701 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*. (standards.iteh.ai)

ISO 11701:2009  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee09-4807-9144-5493346466de/iso-11701-2009>

# Corps gras d'origine végétale — Détermination de la teneur en phospholipides dans les lécithines par CLHP avec détecteur à diffusion de la lumière

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dosage quantitatif des phospholipides par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en utilisant une colonne de diol et un détecteur à diffusion de la lumière.

La méthode est applicable aux lécithines brutes contenant de l'huile, aux lécithines exemptes d'huile et aux fractions de lécithine provenant de corps gras d'origine végétale.

La méthode n'est applicable ni aux lécithines d'origine animale et provenant de ruminants, ni aux lécithines hydrolysées par des enzymes, la séparation des pics de la lysophosphatidyléthanolamine (LPE), du lysophosphatidylinositol (LPI) et de l'acide lysophosphatidique (LPA) étant insuffisante.

## 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 s'applique (y compris les éventuels amendements).

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

## 3 Termes et définitions

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

### 3.1

#### teneur en phospholipide individuel

fraction massique de *N*-acyl-phosphatidyléthanolamine (*N*-acyl-PE), ou de phosphatidylcholine (PC) ou de phosphatidyléthanolamine (PE) ou de phosphatidylinositol (PI) ou d'acide phosphatidique (PA) ou de lysophosphatidylcholine (LPC), déterminée conformément à la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

NOTE La teneur est exprimée en grammes par 100 g, numériquement égale à une fraction massique en pourcentage.

## 4 Principe

Les phospholipides individuels sont séparés par CLHP en utilisant une colonne de diol et un détecteur à diffusion de la lumière. Pour la quantification, un mélange de référence certifié est utilisé.

## 5 Réactifs

**AVERTISSEMENT — Se conformer aux réglementations locales spécifiant comment manipuler les substances dangereuses. Des mesures de sécurité d'ordre technique, organisationnel et personnel doivent être suivies.**

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

**5.1 Eau**, de qualité CLHP.

**5.2 *n*-Hexane**, de qualité CLHP.

**5.3 2-Propanol**, de qualité CLHP.

**5.4 Acide acétique**,  $w_{\min}$ , fraction massique 99,8 %.

**5.5 Triéthylamine**.

**5.6 Mélange solvant**: Un mélange de 80 ml de *n*-hexane (5.2) et de 20 ml de 2-propanol (5.3) (fraction volumique  $\varphi = 80$  ml/100 ml de *n*-hexane et  $\varphi = 20$  ml/100 ml de 2-propanol) est utilisé pour dissoudre les étalons et l'échantillon.

**5.7 Substance de référence (étalon externe) ILPS-LE01<sup>1)</sup>**, étalon de référence constitué d'un mélange de phospholipides de soja, qui est un mélange de référence certifié ayant une teneur définie en *N*-acyl-PE, PA, PE, PC, PI et LPC.

**5.8 Phase mobile de CLHP**.

**5.8.1 Éluant A**: Mélanger 814,2 ml de *n*-hexane (5.2), 170,0 ml de 2-propanol (5.3), 15 ml d'acide acétique (5.4) et 0,8 ml de triéthylamine (5.5) (fraction volumique  $\varphi = 81,42$  ml/100 ml de *n*-hexane,  $\varphi = 17,00$  ml/100 ml de 2-propanol,  $\varphi = 1,50$  ml/100 ml d'acide acétique et  $\varphi = 0,08$  ml/100 ml de triéthylamine).

Pour obtenir une composition d'éluant reproductible, il est recommandé de peser les solvants en tenant compte de leur masse volumique. Pour une taille de lot de 2,5 l: 1 341,4 g de *n*-hexane, 331,5 g de 2-propanol, 39,4 g d'acide acétique et 1,45 g (2,0 ml) de triéthylamine.

**5.8.2 Éluant B**: Mélanger 844,2 ml de 2-propanol (5.3), 140 ml d'eau (5.1), 15,0 ml d'acide acétique (5.4) et 0,8 ml de triéthylamine (5.5) (fraction volumique  $\varphi = 84,42$  ml/100 ml de 2-propanol,  $\varphi = 14,00$  ml/100 ml d'eau,  $\varphi = 1,50$  ml/100 ml d'acide acétique et  $\varphi = 0,08$  ml/100 ml de triéthylamine).

Pour obtenir une composition d'éluant reproductible, il est recommandé de peser les solvants en tenant compte de leur masse volumique. Pour une taille de lot de 2,5 l: 1 646,2 g de 2-propanol, 350,0 g d'eau, 39,4 g d'acide acétique et 1,45 g (2,0 ml) de triéthylamine.

## 6 Appareillage

**6.1 Balance analytique**, pouvant être lue à 0,000 1 g près.

---

1) ILPS-LE01 est l'appellation commerciale d'un produit fourni par l'International Lecithin and Phospholipid Society. 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.

**6.2 Équipement classique de CLHP** équipé d'une pompe à gradient et d'un détecteur à diffusion de la lumière.

**6.3 Four pour colonne CLHP**, réglable à 55 °C.

**6.4 Dégazeur** ou équipement similaire permettant de dégazer l'éluant.

**6.5 Colonne CLHP** (250 mm × 4,0 mm) avec pré-colonne (20 mm × 4,0 mm) garnie de microparticules sphériques (5 µm) de silice greffée diol, par exemple LiChrospher 100 diol (5 µm)<sup>2)</sup>. L'âge et les antécédents de la colonne, le conditionnement du matériau de garnissage de la colonne et la température peuvent avoir une incidence sur la séparation.

**6.6 Fioles jaugées à un trait**, de capacités 50 ml, 100 ml et 2 500 ml, ISO 1042<sup>[1]</sup> classe A.

**6.7 Seringue**, de capacité 25 µl, graduée en microlitres.

**6.8 Filtre** permettant de filtrer les solutions d'étalon externe et d'échantillon pour essai, par exemple Millex HV<sup>3)</sup>.

**6.9 Système d'intégration.**

## 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 indiquée dans l'ISO 5555<sup>[2]</sup>.

[ISO 11701:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee09-4807-9144-54933461664b/iso-11701-2009)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee09-4807-9144-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3e1ac1f1-ee09-4807-9144-54933461664b/iso-11701-2009)

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir l'ISO 661.

Pour ramollir l'échantillon, le faire chauffer jusqu'à 60 °C maximum (éviter de le surchauffer), puis l'homogénéiser en l'agitant vigoureusement.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Préparation des solutions étalons de référence et des prises d'essai

#### 9.1.1 Solutions étalons de référence R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub>

Préparer trois solutions étalons de référence différentes. Pour ce faire, peser avec exactitude dans trois fioles jaugées de 100 ml approximativement 550 mg, 850 mg et 1 150 mg de la substance de référence certifiée (5.7), dissoudre dans le mélange solvant (5.6) et compléter au trait avec le même solvant.

2) LiChrospher 100 diol est l'appellation commerciale d'un produit fourni par Merck. 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.

3) Exemple de produit disponible sur le marché. 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.

Filtrer (6.8) les solutions étalons de référence avant injection en CLHP.

**9.1.2 Solutions d'échantillon pour essai et prises d'essai**

Peser, à 0,001 g près, 425 mg d'échantillon dans le cas de la lécithine brute ou 255 mg d'échantillon dans le cas de la lécithine déshuilée ou fractionnée, dans des fioles jaugées distinctes de 50 ml; dissoudre dans le mélange solvant (5.6) et compléter au trait avec le même solvant.

Filtrer (6.8) les solutions d'échantillons pour essai avant d'y prélever des prises d'essai S<sub>1a</sub> et S<sub>1b</sub>.

**9.2 Analyse CLHP**

Régler les conditions opératoires de l'équipement en utilisant les échantillons pour essai et les échantillons de référence de façon à obtenir une séparation conforme au chromatogramme à la Figure A.1. Optimiser le profil de séparation en fonction du type de la colonne et du gradient. Les conditions suivantes sont recommandées (voir Tableau 1):

- Température du four: 55 °C
- Sensibilité du détecteur: 5 à 6
- Température du détecteur: 50 °C
- Pression du détecteur: 0,20 MPa (2,0 bar)
- Débit: 1,0 ml/min
- Débit pour le rinçage de la colonne: 2,0 ml/min

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 11701:2009

Tableau 1 — Programme de gradient pour CLHP

Temps min	Éluant A %	Éluant B %	Débit ml/min
0,0	95	5	1,0
5,0	80	20	1,0
8,5	60	40	1,0
15,0	0	100	1,0
17,5	0	100	1,0
17,6	95	5	1,0
21,0	95	5	1,0
22,0	95	5	2,0
27,0	95	5	2,0
29,0	95	5	1,0

**9.3 Étalonnage**

Utiliser des volumes d'injection de 20 µl pour calculer les droites de régression linéaire et pour déterminer la composition de l'échantillon pour essai. Tracer une courbe d'étalonnage en représentant les aires de pic en fonction des concentrations.



NOTE Les détecteurs à diffusion de la lumière ne fournissent pas des données linéaires sur toute la plage (courbes d'étalonnage en forme de S). La concentration des solutions étalons de référence a été choisie dans la plage de linéarité.

La séquence d'analyse suivante est recommandée pour le dosage quantitatif des phospholipides : R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> (une injection chacune), S<sub>1a</sub>, S<sub>1b</sub> (prises d'essai prélevées à partir de l'échantillon pour essai, deux injections chacune), R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> (une injection chacune).

## 9.4 Dosage

Injecter 20 µl de la solution d'échantillon pour essai en CLHP et enregistrer les aires de pic. Identifier les pics en comparant les temps de rétention de la substance sur les chromatogrammes des solutions étalons de référence et des prises d'essai (voir Figure A.1).

## 10 Calcul et expression des résultats

Utiliser la courbe d'étalonnage pour calculer la teneur en chaque phospholipide individuel (voir 9.3). En comparaison avec l'échantillon, trois points d'étalonnage doivent avoir des concentrations inférieures et trois points d'étalonnage doivent avoir des concentrations supérieures. Les solutions R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> (9.1.1) sont diluées en fonction de l'échantillon afin d'obtenir les six points d'étalonnage.

La fraction massique,  $w_i$ , en grammes par 100 g de l'échantillon pour essai, de chaque phospholipide individuel est donnée par:

$$w_i = \frac{m_{pi}}{m} \times 100$$

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

où

$m_{pi}$  est la masse, en milligrammes, du phospholipide individuel déterminée à partir de la courbe d'étalonnage;

$m$  est la masse, en milligrammes, de l'échantillon pour essai (9.1.2).

Exprimer le résultat avec un chiffre après la virgule.

## 11 Fidélité de la méthode

### 11.1 Essai interlaboratoires

Les détails d'un essai interlaboratoires relatif à la fidélité de la méthode sont récapitulés à l'Annexe B. Les valeurs obtenues à partir de cet essai interlaboratoires peuvent ne pas être applicables à des plages de concentrations et à des matrices autres que celles indiquées.

### 11.2 Répétabilité

La limite de répétabilité,  $r$ , est la valeur au-dessous de laquelle est située la valeur absolue de la différence entre deux valeurs finales, chacune d'elles représentant une série de résultats d'essai, obtenus dans des conditions de répétabilité, avec une probabilité de 95 %.

Des conditions de répétabilité se définissent comme des conditions dans lesquelles les résultats d'essai sont obtenus selon une même méthode, avec un matériau d'essai identique, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement et les mêmes réactifs, dans un court laps de temps.