
**Corps gras d'origines animale et
végétale — Détermination enzymatique
de la teneur en stérols totaux**

*Animal and vegetable fats and oils — Enzymatic determination of total
sterols content*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11702:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>



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 11702:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>



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
Web www.iso.org

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 11702 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 11702:2009
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11702:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a0a1352f-d235-4460-b35f-f7081670d3c3/iso-11702-2009>

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination enzymatique de la teneur en stérols totaux

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour la détermination quantitative de la teneur en stérols totaux à l'aide d'un essai de coloration enzymatique. La méthode s'applique aux stérols libres et estérifiés, contenus dans les corps gras d'origines animale et végétale, dans les aliments gras et les produits connexes. La détermination s'applique aux quantités d'échantillon de 1 g à 2 g de matière grasse.

Cette méthode ne s'applique pas aux corps gras de couleur sombre comme l'huile de palme brute. L'enzyme n'est pas spécifique du cholestérol et oxyde également d'autres 3-hydroxystérols. La méthode n'a pas été testée pour des produits enrichis avec des stérols à des niveaux plus élevés.

NOTE La méthode est techniquement équivalente à la méthode IUPAC 2.404^[8] et à la méthode normalisée DGF F-III 2 (91)^[7].

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*

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

3 Termes et définitions

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

3.1

teneur en stérols totaux

$W_{\text{stérols}}$

fraction massique de stérols déterminée par la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

NOTE 1 Pour les corps gras d'origine végétale, la teneur en stérols est exprimée sous forme de β -sitostérol; pour les matières grasses d'origine animale, elle est exprimée sous forme de cholestérol.

NOTE 2 La teneur en stérols est exprimée en milligrammes par 100 g de matière grasse.

4 Principe

L'échantillon est saponifié et les stérols présents dans la matière insaponifiable sont déterminés par voie enzymatique. Ils sont oxydés par la cholestérol oxydase en cholesténone. La quantité équimolaire de peroxyde d'hydrogène produite au cours du processus oxyde le méthanol en formaldéhyde en présence de catalase. Le formaldéhyde réagit avec l'acétylacétone, en présence d'ions ammonium, pour former de la lutidine de coloration jaune (3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine). La lutidine est déterminée par

spectrophotométrie dans le domaine visible à 405 nm. La concentration en lutidine est équivalente à la quantité de stérols.

NOTE La cholestérol oxydase oxyde le cholestérol ainsi que d'autres stérols ayant un groupe hydroxyle à la position 3 β . Par conséquent, les phytostérols comme le stigmasterol et le sitostérol sont également déterminés.

5 Réactifs

AVERTISSEMENT — L'attention est attirée sur les règlements qui régissent la manipulation des substances dangereuses. Des mesures de sécurité d'ordre technique, organisationnel et du personnel doivent être suivies.

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

5.1 Eau, conforme à l'ISO 3696, qualité 3 ou mieux.

5.2 Isopropanol.

5.3 Acétone.

5.4 Acétylacétone.

5.5 Cholestérol oxydase en suspension¹⁾ (EC 1.1.3.6) de *Nocardia erythropolis*, 15 U/ml.

5.6 Catalase en suspension (peroxyde d'hydrogène oxydo-réductase)¹⁾ (EC 1.11.1.6) de foie de bœuf.

5.7 Acide chlorhydrique, $c(\text{HCl}) = 8 \text{ mol/l}$.

5.8 Solution méthanolique d'hydroxyde de potassium, $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 2,8 g d'hydroxyde de potassium dans une petite quantité de méthanol chaud, laisser refroidir et diluer avec du méthanol à 100 ml.

5.9 Solution tampon de phosphate d'ammonium, ajustée à pH 7.

5.10 Solution 1.

Ajouter 19,1 ml d'acétone (5.3) et 230 000 U de catalase (5.6) à 50 ml de la solution tampon (5.9) dans une fiole jaugée de 100 ml (6.4), et compléter au trait avec de l'eau (5.1).

5.11 Solution 2.

Ajouter 0,26 ml d'acétylacétone (5.4) et 1,10 ml d'acétone (5.3) à 25 ml d'eau (5.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.4), et compléter au trait avec de l'eau.

1) Un kit d'essai prêt à l'emploi approprié pour un enfant pour la détermination du cholestérol dans les produits alimentaires et d'autres matériaux est disponible auprès de R-biopharm. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.12 Solution 3.

Avant utilisation, mélanger 3 parties en volume de la solution 1 (5.10) et 2 parties en volume de la solution 2 (5.11).

NOTE La solution 3 peut se conserver dans des flacons ambrés pendant 3 mois à 4 °C sous réserve d'avoir été préparée dans des conditions stériles.

6 Appareillage

- 6.1 Tubes à essai, de 18 mm de diamètre.
- 6.2 Entonnoir filtrant.
- 6.3 Filtre plissé adapté à l'entonnoir filtrant (6.2).
- 6.4 Fioles jaugées à un trait, de capacités 25 ml, 50 ml et 100 ml, ISO 1042^[2] classe A.
- 6.5 Pipettes pour enzymes, d'une capacité allant de 0,02 ml, ISO 7550^[6], à 1 ml, ISO 648^[1] classe A.
- 6.6 Pipette graduée, d'une capacité de 5 ml, ISO 648^[1] classe A.
- 6.7 Ballon à fond rond, à col rodé normal, d'une capacité de 50 ml.
- 6.8 Tubes à essai munis de bouchons rodés.
- 6.9 Spectrophotomètre, réglé à 405 nm.
- 6.10 Cuves en verre, trajet optique de 1 cm, convenant pour le spectrophotomètre (6.9).
- 6.11 Bain d'eau, à commande thermostatique, réglé entre 37 °C et 40 °C.
- 6.12 Réfrigérateur, permettant de maintenir une température de 4 °C.
- 6.13 Billes de verre.
- 6.14 Réfrigérant à reflux, à col rodé normal.

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 faisant pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale, il est recommandé de suivre la méthode indiquée dans l'ISO 5555^[3].

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 661. Le traitement spécifique subi par l'échantillon pour essai (filtration, fusion, etc.) doit être mentionné dans le rapport d'essai.

9 Mode opératoire

9.1 Saponification

9.1.1 Peser entre 1 g et 2 g d'échantillon avec exactitude à 0,001 g près dans un ballon à fond rond de 50 ml (6.7). La concentration en stérols dans la solution d'essai doit être comprise entre 0,02 g/l et 0,4 g/l. Cette exigence doit être prise en compte lors des opérations de pesée et de dilution. Dans le cas de graisses saturées, la quantité pesée doit être réduite, sinon les acides gras libres qui se sont formés après la saponification et l'acidification ne sont pas complètement éliminés pendant la filtration et ont une incidence sur la détermination. Une solution limpide doit toujours être obtenue.

9.1.2 Ajouter 10 ml de la solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (5.8) et quelques billes de verre (6.13). Chauffer le mélange et faire bouillir à reflux pendant 25 min.

9.1.3 Transvaser la solution de savon encore chaude quantitativement dans une fiole jaugée de 25 ml (6.4) et rincer le ballon à fond rond avec quelques millilitres d'isopropanol (5.2).

9.1.4 Au moyen d'une pipette (6.5), ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique (5.7) dans la fiole jaugée de 25 ml, compléter au trait avec de l'isopropanol (5.2) et agiter vigoureusement. Une solution limpide doit toujours être obtenue.

9.1.5 Mettre la fiole contenant le mélange (9.1.4) au réfrigérateur (6.12) et l'y maintenir 20 min à 4 °C.

9.1.6 Ensuite, filtrer la solution (trouble) aussi rapidement que possible sur un filtre plissé (6.3) et utiliser immédiatement le filtrat pour la détermination enzymatique.

9.2 Détermination enzymatique de la teneur en stérols

9.2.1 Au moyen d'une pipette (6.6), remplir un tube à essai (6.1) avec 5 ml de la solution 3 (5.12) et 0,4 ml du filtrat (9.1.6), puis bien mélanger.

9.2.2 Transférer 2,5 ml de ce mélange dans un tube à essai (6.8) et, au moyen d'une pipette (6.5), ajouter 0,02 ml de cholestérol oxydase en suspension (5.5). Bien mélanger.

9.2.3 Transférer le reste de la solution en 9.2.1 dans un autre tube à essai (6.8) pour l'essai à blanc.

9.2.4 Fermer les deux tubes contenant l'échantillon et le blanc avec des bouchons et les faire incuber dans le bain d'eau pendant 60 min à une température comprise entre 37 °C et 40 °C.

9.2.5 Après refroidissement à la température ambiante, mesurer immédiatement l'absorbance de l'échantillon et du blanc, successivement dans la même cuve, par rapport à l'eau (5.1) dans le spectrophotomètre à 405 nm.

10 Résultat de la détermination

La concentration massique des stérols totaux, ρ , en grammes par litre, du filtrat issu de l'échantillon, exprimée sous forme de cholestérol dans le cas des matières grasses d'origine animale et de β -sitostérol dans le cas des corps gras d'origine végétale, est calculée d'après l'Équation (1):

$$\rho = \frac{V_1 M}{\varepsilon l V_2 \times 1000} \Delta A \quad (1)$$

où

V_1 est le volume, en millilitres, du filtrat dilué (5,4 ml, voir 9.2.1);

M est la masse moléculaire du cholestérol ($M_{\text{chol}} = 386,64 \text{ g/mol}$) ou du β -sitosterol ($M_{\beta\text{-sito}} = 414,69 \text{ g/mol}$);

ε est l'absorbance [coefficient d'extinction] de la lutidine à 405 nm ($7,4 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

l est le trajet optique, en centimètres, de la cuve en verre (1 cm);

V_2 est le volume, en millilitres, du filtrat non dilué (0,4 ml, voir 9.2.1);

ΔA est la différence entre l'absorbance du blanc et l'absorbance de la prise d'essai, le facteur de dilution de 1,008 (2,52/2,50) devant être pris en compte:

$$\Delta A = 1,008 (A_1 - A_0)$$

dans laquelle

A_1 est l'absorbance de la prise d'essai à 405 nm;

A_0 est l'absorbance du blanc à 405 nm.

La concentration massique des stérols totaux, ρ , en grammes par litre, de filtrat issu de l'échantillon est ensuite calculée soit par l'Équation (2) pour les corps gras d'origine animale:

$$\rho_{\text{chol}} = \frac{5,400 \times 386,64 \times 1,008}{7,4 \times 1,00 \times 0,400 \times 1000} \Delta A = 0,711 \Delta A \quad (2)$$

soit par l'Équation (3) pour les corps gras d'origine végétale:

$$\rho_{\beta\text{-sito}} = \frac{5,400 \times 414,69 \times 1,008}{7,4 \times 1,00 \times 0,400 \times 1000} \Delta A = 0,763 \Delta A \quad (3)$$

Considérant la dilution (25 ml en 9.1.4), la teneur en stérols totaux, w_{sterols} , de l'échantillon, en milligrammes pour 100 g, est donc calculée par l'Équation (4):

$$w_{\text{sterols}} = \frac{25 \times 100 \times 1000 \rho}{1000 m} \quad (4)$$

où m est la masse en grammes de la prise d'essai (9.1.1).

La fraction massique de stérols totaux (sur la base du cholestérol ou du β -sitostérol) est donnée en nombre entier sans décimale.

11 Fidélité de la méthode

11.1 Essai interlaboratoires

Les détails de l'essai interlaboratoires relatifs à la fidélité de la méthode sont récapitulés dans l'Annexe A. Les valeurs obtenues à partir de cet essai interlaboratoires peuvent ne pas être applicables à des plages de concentration et à des matrices autres que celles indiquées.