

ISO/TC 34/SC 11

Secrétariat: BSI

Début de vote:
2016-02-25

Vote clos le:
2016-05-25

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)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/afae83c-ace1-4770-a979-98535ff6f9bc/iso-11702-2016>

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

Veillez consulter les notes administratives en page iii



Numéro de référence
ISO/FDIS 11702:2016(F)

TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN

Le présent projet final a été élaboré dans le cadre de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et soumis selon le mode de collaboration **sous la direction de l'ISO**, tel que défini dans l'Accord de Vienne. Le projet final a été établi sur la base des observations reçues lors de l'enquête parallèle sur le projet.

Le projet final est par conséquent soumis aux comités membres de l'ISO et aux comités membres du CEN en parallèle à un vote d'approbation de deux mois au sein de l'ISO et à un vote formel au sein du CEN.

Les votes positifs ne doivent pas être accompagnés d'observations.

Les votes négatifs doivent être accompagnés des arguments techniques pertinents.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/abaae83c-ace1-4770-a979-98535ff6f9bc/iso-11702-2016>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2016, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

| | |
|--|----------|
| Avant-propos..... | iv |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 1 |
| 4 Principe | 1 |
| 5 Réactifs | 2 |
| 6 Appareillage | 3 |
| 7 Échantillonnage | 3 |
| 8 Préparation de l'échantillon pour essai | 3 |
| 9 Mode opératoire | 4 |
| 10 Résultat de la détermination | 4 |
| 11 Fidélité de la méthode | 5 |
| 11.1 Essai interlaboratoires..... | 5 |
| 11.2 Limite de répétabilité..... | 5 |
| 11.3 Limite de reproductibilité..... | 6 |
| 12 Rapport d'essai | 6 |
| Annexe A (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires | 7 |
| Bibliographie | 8 |

PREVIEW
 iTeh STANDARD
 (standard.itih.ai)
 Full standard available on
<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/abanc83c-ace1-4770-a979-98535ff619bc/iso-11702-2016>

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'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 11702:2009), dont elle constitue une révision mineure.

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. 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.

Le lait et les produits laitiers (ou les corps gras issus du lait et des produits laitiers) sont exclus du domaine d'application de la présente Norme internationale.

NOTE Cette 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 ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 à l'article: 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 à l'article: La teneur en stérols totaux 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 le cholestérol oxydase en cholesténone. La quantité équimolaire de peroxyde d'hydrogène produite au cours du processus oxyde le méthanol en formaldéhyde en présence d'une catalase. Le formaldéhyde réagit avec l'acétylacétone en présence des ions ammonium, pour former un dérivé de la lutidine de couleur jaune (3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine). Ce composé

coloré est déterminé par spectrophotométrie dans le domaine visible à 405 nm. La concentration en composé coloré 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 3β. 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. Les mesures de sécurité sur les plans 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, de qualité 3 ou mieux.

5.2 Isopropanol.

5.3 Acétone.

5.4 Acétylacétone.

5.5 Cholestérol oxydase en suspension,¹⁾ (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 boeuf.

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

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

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 à un trait de 50 ml (6.4), et compléter au trait avec de l'eau.

1) Un kit d'essai prêt à l'emploi approprié 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 trois 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 capacité 25 ml, 50 ml et 100 ml, selon l'ISO 1042^[2] classe A.

6.5 **Pipettes pour enzymes**, d'une capacité allant de 0,02 ml, ISO 7550^[6] à 1 ml, selon l'ISO 648^[1] classe A.

6.6 **Pipette graduée**, d'une capacité de 5 ml, selon l'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**, ayant un 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**, réglé à 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 et de l'entreposage.

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^[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 et introduire cette quantité de produit 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). Faire 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 à un trait (6.4) de 25 ml et rincer le ballon à fond rond (6.7) 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 à un trait (6.4) 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), introduire dans un tube à essai (6.1) 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 de 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 (6.11) pendant 60 min 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 par rapport à l'eau (5.1), successivement dans la même cuve, dans le spectrophotomètre (6.9) à 405 nm.

10 Résultat de la détermination

La concentration massique en 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 la Formule (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 -sitostérol ($M_{\beta\text{-sito}} = 414,69 \text{ g/mol}$);

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 celle 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 en stérols totaux, ρ , en grammes par litre, du filtrat issu de l'échantillon est ensuite calculée soit à l'aide de la Formule (2) pour les corps gras d'origine animale:

$$\rho_{\text{chol}} = \frac{5,400 \times 386,64 \times 1,008}{7,4 \times 1,00 \times 0,400 \times 1\,000} \Delta A = 0,711 \Delta A \quad (2)$$

soit à l'aide de la Formule (3), pour les corps gras d'origine végétale:

$$\rho_{\beta\text{-sito}} = \frac{5,400 \times 414,69 \times 1,008}{7,4 \times 1,00 \times 0,400 \times 1\,000} \Delta A = 0,763 \Delta A \quad (3)$$

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 d'après la Formule (4):

$$w_{\text{sterols}} = \frac{25 \times 100 \times 1\,000 \rho}{1\,000 m} \quad (4)$$

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 sous forme de nombre entier.

11 Fidélité de la méthode

11.1 Essai interlaboratoires

Les précisions concernant l'essai interlaboratoires relatif à la fidélité de la méthode sont résumées dans l'[Annexe A](#). Les valeurs dérivées de cet essai interlaboratoires peuvent ne pas s'appliquer à d'autres plages de concentration et matrices que celles indiquées.

11.2 Limite de répétabilité

La limite de répétabilité, r , est la valeur inférieure ou égale à la différence absolue entre deux valeurs finales, chacune d'elles représentant une série de résultats d'essai obtenus dans des conditions de répétabilité, pouvant être attendue avec une probabilité de 95 %.