

---

---

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

iTeh STANDARD PREVIEW

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

[ISO 15302:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/46c5bf06-1432-425e-aeaa-3f9a2e0ec07c/iso-15302-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/46c5bf06-1432-425e-aeaa-3f9a2e0ec07c/iso-15302-2017>



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

ISO 15302:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/46c5bf06-1432-425e-aeaa-3f9a2e0ec07c/iso-15302-2017>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2017, 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
<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>1</b>
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>4</b>
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>4</b>
9.1    Récupération de l'échantillon.....	4
9.2    Chromatographie liquide à haute performance.....	5
9.3    Analyse de l'échantillon.....	5
<b>10</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>6</b>
10.1    Calcul des facteurs de réponse relatifs.....	6
10.2    Calcul de la teneur en benzo[ <i>a</i> ]pyrène.....	7
<b>11</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>7</b>
11.1    Répétabilité.....	7
11.2    Reproductibilité.....	7
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe A (informative) Résultats des essais interlaboratoires</b> .....	<b>8</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>9</b>

## 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](http://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](http://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.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la nature volontaire des normes, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, Sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 15302:2007), dont elle constitue une révision mineure. Le domaine d'application du présent document a été révisé pour exclure son application au lait et aux produits laitiers et leurs dérivés.

# 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

Le présent document 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.

Le lait et les produits laitiers (ou les corps gras issus du lait et des produits laitiers) sont exclus du domaine d'application du présent document.

## 2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

### 3.1

#### teneur en benzo[*a*]pyrène

fraction massique de benzo[*a*]pyrène dans la prise d'essai, déterminée par la méthode spécifiée dans le présent document

Note 1 à l'article: 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 porosité 0,45 µm. Il est également possible d'utiliser de l'eau désionisée 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.**

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. Dissoudre cette quantité dans le toluène (5.6) et remplir jusqu'au trait avec ce solvant.

Conserver la solution à l'abri de la lumière à 4 °C où elle reste stable pendant au moins 6 mois.

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 du présent document 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 peut être obtenu 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 du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

### 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.

### 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

Matériel 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 ± 2) °C et l'autre à (65 ± 2) °C.

**6.3 Évaporateur éclair**, 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. (standards.iteh.ai)

**6.4 Système de 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 l'on utilise un échantillonneur automatique, 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 (de granulométrie 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.

3) Un matériau de référence approprié peut être obtenu 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 du présent document 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 du présent document 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.

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

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

**6.9 Pipettes jetables.**

## 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 le présent document. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée 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 bûcher en verre et 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 microseringue. Cela équivaut à 50 µg/kg lorsque le calcul porte sur la masse de l'échantillon. Si l'on s'attend à 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 bûcher, les transvaser immédiatement dans la colonne, puis tapoter délicatement sur 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 20 premiers millilitres 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 1,0 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.

ISO 15302:2017

## 9.3 Analyse de l'échantillon

**9.3.1** Injecter 250 µl du mélange d'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 veiller à ne pas introduire plus de 1,5 mg de résidu dans la colonne. Un exemple de chromatogramme est donné à la Figure 1. 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.