
**Corps gras d'origines végétale et
animale — Dosage des stérols et
des stanols dans les aliments et les
compléments alimentaires contenant
des phytostérols ajoutés**

*Animal and vegetable fats and oils — Determination of sterols
and stanols in foods and dietary supplements containing added
phytosterols*

(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 23349:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/407cb913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/407cb913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020>



iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 23349:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/407cb913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/407cb913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs	1
6 Appareillage	2
7 Échantillonnage	4
8 Prise d'essai	4
9 Mode opératoire	4
9.1 Sélection du protocole d'analyse.....	4
9.2 Protocole de dilution et d'injection.....	5
9.3 Protocoles alcalins de 15 min et 120 min.....	5
9.4 Protocole acide de 45 min/alcalin de 15 min.....	6
10 Chromatographie en phase gazeuse	6
11 Identification des pics	7
12 Calculs	8
13 Contrôle qualité/assurance qualité	8
14 Fidélité	9
Annexe A (normative) Chromatogrammes en phase gazeuse de référence	10
Annexe B (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires	14
Bibliographie	32

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 attirée 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 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 www.iso.org/avant-propos.

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*. 913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les stérols et stanols végétaux, collectivement désignés phytostérols, jouissent d'une reconnaissance croissante pour leur rôle dans la réduction du risque de maladie coronarienne en diminuant le cholestérol total sérique et le cholestérol à lipoprotéines de basse densité. Ces bienfaits potentiels sur la santé ont contribué à l'émergence de réglementations relatives aux allégations de santé qui autorisent l'ajout de phytostérols et d'esters de phytostérols aux aliments et compléments alimentaires dans des pays à travers l'Europe, l'Amérique du Nord et du Sud et l'Asie, ainsi qu'en Nouvelle-Zélande et en Australie.

Le présent document a été élaboré en réponse à la demande mondiale d'une méthode de référence pour la quantification des phytostérols totaux et individuels dans les aliments et les compléments alimentaires contenant des phytostérols ajoutés ainsi que les additifs alimentaires concentrés en phytostérols utilisés dans la préparation de ces produits. Cette méthode de référence s'appuie sur les méthodes validées dans un seul laboratoire de Clement et al.^[1] et de Srigley et Haile^[2] pour la préparation et la séparation par chromatographie en phase gazeuse des dérivés de triméthylsilyléthers de phytostérols, respectivement.

En 2016–2017, une étude interlaboratoires internationale, co-organisée par la United States Food and Drug Administration (FDA), Cargill (USA), et l'American Oil Chemists' Society (AOCS), a été menée pour évaluer les performances de cette méthode pour le dosage des phytostérols totaux et individuels dans les aliments et les compléments alimentaires ainsi que les concentrés de phytostérols.^[3] Au total, 14 laboratoires de six pays ont procédé avec succès à l'analyse de 18 matériaux d'essai, à la suite de quoi la méthode a été approuvée comme méthode officielle Ce 12-16 de l'AOCS^[4].

Cette méthode de référence convient pour le dosage de cinq phytostérols majeurs (à savoir le campestérol, le campestanol, le stigmastérol, le β -sitostérol et le sitostanol) qui sont soumis à la réglementation de la FDA relative aux allégations de santé impliquant les phytostérols et le risque réduit de maladie coronarienne^[5].

[ISO 23349:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/407cb913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/407cb913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020>

Corps gras d'origines végétale et animale — Dosage des stérols et des stanols dans les aliments et les compléments alimentaires contenant des phytostérols ajoutés

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de référence pour le dosage des stérols/stanols libres et des esters de stérols/stanols (0,1 % à 97 % de fraction massique) dans les aliments et les compléments alimentaires contenant des phytostérols ajoutés et dans les additifs alimentaires concentrés en phytostérols.

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. Cette méthode ne s'applique pas aux matrices d'une teneur supérieure à 20 % en huile de son de riz en raison des interférences éventuelles dans le chromatogramme en phase gazeuse.

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

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

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

4 Principe

Les stérols/stanols libres et les esters de stérols/stanols saponifiés sont dérivés en triméthylsilyléthers de phytostérols (TMS) et séparés à l'aide d'une colonne capillaire de chromatographie en phase gazeuse.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

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. Une hotte de chimie doit être utilisée pour les travaux.

5.1 Pyridine

5.2 *N,O*-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide +1 % triméthylchlorosilane (BSTFA).

5.3 Solvant de dissolution pour l'étalon interne, toluène (recommandé) ou acétate d'éthyle.

5.4 Méthanol.

5.5 Hydroxyde de sodium, granules, d'une pureté ≥ 97 %.

5.6 Solution d'hydroxyde de sodium, 2,3 N.

Peser 92 g d'hydroxyde de sodium (5.5) dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.14). Ajouter un barreau d'agitation (6.20) et 750 ml de méthanol (5.4). Placer la fiole sur un agitateur magnétique (6.21) pour procéder à la dispersion. Diluer jusqu'au volume avec du méthanol et retourner la fiole pour mélanger. La solution d'hydroxyde de sodium doit être agitée à nouveau avant emploi, car elle se décante au fil du temps.

5.7 Acide chlorhydrique, 3,0 N.

5.8 Épicoprostanol (5 β -cholestan-3 α -ol), d'une pureté > 95 %.

5.9 Solution d'étalon interne (EI) d'épicoprostanol, 5 mg/ml.

Peser précisément 5,0 g d'épicoprostanol (5.8) dans une nacelle de pesée en verre (6.8). Transférer l'épicoprostanol dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.14). Rincer la nacelle avec du solvant de dissolution pour l'étalon interne (5.3) et verser dans la fiole. Diluer jusqu'au volume avec du toluène ou de l'acétate d'éthyle et retourner la fiole pour mélanger. La solution d'EI d'épicoprostanol d'une concentration de 5 mg/ml est utilisée pour l'analyse des concentrés de stérols/stanols, des concentrés d'esters de stérols/stanols et de certains compléments alimentaires.

5.10 Solution d'étalon interne (EI) d'épicoprostanol, 2 mg/ml.

Peser précisément 2,0 g d'épicoprostanol (5.8) dans une nacelle de pesée en verre (6.8). Transférer l'épicoprostanol dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.14). Rincer la nacelle avec du solvant de dissolution pour l'étalon interne (5.3) et verser dans la fiole. Diluer jusqu'au volume avec du toluène ou de l'acétate d'éthyle et retourner la fiole pour mélanger. La solution d'EI d'épicoprostanol d'une concentration de 2 mg/ml est utilisée pour l'analyse des aliments et de certains compléments alimentaires.

5.11 Phytostérols, mélange de stérols de soja, étalon de référence pour la chromatographie en phase gazeuse.

5.12 Sulfate de sodium, anhydre, granules, d'une pureté ≥ 99 %.

5.13 Chlorure de sodium, cristallin, d'une pureté ≥ 99 %.

5.14 Solution de chlorure de sodium, saturée.

Peser environ 400 g de chlorure de sodium (5.13) dans un flacon de stockage (6.15). Diluer avec 1 000 ml d'eau déionisée.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment ce qui suit.

6.1 Système de chromatographie en phase gazeuse, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un système d'injection capillaire à diviseur de flux.

6.2 Gaz vecteur, hydrogène (recommandé) ou hélium, d'une pureté $\geq 99,99$ %, de qualité chromatographie en phase gazeuse, séché, l'oxygène ayant été éliminé à l'aide de filtres adaptés ($<0,1$ mg/kg), exempt d'impuretés organiques.

6.3 Autres gaz, azote, hydrogène et air synthétique, de qualité chromatographie en phase gazeuse et d'une pureté $\geq 99,99\%$.

6.4 Colonne capillaire, avec une phase stationnaire qui permet de réaliser une séparation satisfaisante des triméthylsilyléthers de phytostérols (TMS).

L'utilisation d'une colonne à phase stationnaire greffée de (5 %-phényl)-méthylpolysiloxane, telle qu'une colonne HP-5, d'une longueur de 30 m, d'un diamètre interne de 0,32 mm et d'une épaisseur de film de 0,25 μm , est recommandée. L'utilisation d'une colonne à phase stationnaire non greffée de (5 %-phényl)(1 %-vinyl)-méthylpolysiloxane, telle qu'une colonne SE-54, d'une longueur de 30 m, d'un diamètre interne de 0,32 mm et d'une épaisseur de film de 0,25 μm est aussi appropriée.

6.5 Insert d'injecteur à débit divisé, conique, désactivé, d'une longueur de 78,5 mm, d'un diamètre interne de 4 mm et d'un diamètre externe de 6,3 mm, avec laine de verre.

6.6 Microseringue, d'une capacité de 10 μl , dotée d'une aiguille renforcée pour la chromatographie en phase gazeuse.

6.7 Système de préparation d'échantillons, adapté aux modes opératoires d'hydrolyse acide et de saponification et équipé des composants suivants.

6.7.1 Ballons à fond rond, d'une capacité de 50 ml, dotés de rodages 24/40.

6.7.2 Manchons pour col de ballon, polytétrafluoroéthylène (PTFE), taille 24/40.

6.7.3 Bouchons en verre, pleine longueur, taille 24/40.

6.7.4 Plaque chauffe-ballon, antidéflagrante.

6.7.5 Condenseurs, avec refroidissement à eau.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/407cb913-9904-45a2-84e4-7dbdc1b3bd7d/iso-23349-2020>

6.8 Nacelles de pesée en verre, adaptées à la prise d'essai, à insérer dans les fioles jaugées (6.14).

6.9 Balance analytique, d'une précision d'affichage de 0,000 1 g et d'une exactitude de pesée de 0,001 g.

6.10 Spatules, avec revêtement en PTFE.

6.11 Pipettes jaugées, d'une capacité de 5 ml, 40 ml et 50 ml, classe A, avec poire d'aspiration.

6.12 Pipette ou pipette automatique, d'une capacité de 1 ml et de 10 ml, avec embouts de pipette.

6.13 Pipettes Pasteur, d'une longueur de 150 mm, avec poire d'aspiration.

6.14 Fioles jaugées, d'une capacité de 100 ml et de 1 000 ml, classe A.

6.15 Flacon de stockage, d'une capacité de 1 000 ml, en verre ou en polyméthylpentène, avec bouchon à vis.

6.16 Tubes à essai en verre, d'une longueur de 100 mm et d'un diamètre extérieur de 13 mm, avec bouchons à vis et revêtement en PTFE.

6.17 Flacons pour passeur d'échantillons, d'une capacité de 2 ml, ambrés, avec bouchons avec revêtement en PTFE.

6.18 Agitateur de type vortex.

6.19 Granulés régulateurs d'ébullition.

6.20 Barreau d'agitation et récupérateur de barreau d'agitation.

6.21 Agitateur magnétique.

7 Échantillonnage

Traiter l'échantillon tel que nécessaire (par exemple, cryobroyage, homogénéisation ou agitation) pour obtenir un matériau composite homogène. Se reporter à la Norme internationale appropriée pour la matrice concernée.

8 Prise d'essai

Se reporter au [Tableau 1](#) pour sélectionner la taille de prise d'essai appropriée et la concentration de la solution d'EI en fonction de la teneur estimée en phytostérols totaux dans l'échantillon.

Tableau 1 — Lignes directrices pour la détermination de la taille de la prise d'essai et de la concentration de la solution d'EI

Type d'échantillon	Teneur en phytostérols % (fraction massique)	Prise d'essai mg	Concentration de l'EI mg/ml	EI ajouté mg
Concentrés de stérols/ stanols	> 90	50	5	25
Concentrés d'esters de stérols/stanols, compléments alimentaires	~50	100	5	25
Aliments et compléments alimentaires	~20	250	5	25
Aliments et compléments alimentaires	~10	500	5	25
Aliments et compléments alimentaires	< 10	1 000	2	10

9 Mode opératoire

9.1 Sélection du protocole d'analyse

Pour des formulations inconnues (matrice et type de phytostérols), déterminer le protocole optimal par triple analyse conformément aux protocoles suivants: a) alcalin de 120 min, b) alcalin de 15 min et c) acide de 45 min/alcalin de 15 min. Sélectionner le protocole qui produit la récupération en phytostérols la plus élevée et la variabilité la plus faible. Affiner encore ce protocole, si nécessaire, en diminuant la durée de saponification de 120 min à 60 min à 30 min ou la durée d'hydrolyse acide de 45 min à 30 min à 15 min, à l'aide d'une triple analyse pour chacun des paramètres. Le protocole optimal

présentera un coefficient de variation de répétabilité ($C_{v,r}$) inférieur à 5 % pour les trois analyses sur une période de cinq jours d'essai.

Le protocole alcalin de 120 min convient à l'analyse de la plupart des aliments et compléments alimentaires contenant des phytostérols ajoutés. Le protocole acide de 45 min/alcalin de 15 min peut être requis pour une libération complète des esters de phytostérols de certaines matrices, telles que certaines céréales.

9.2 Protocole de dilution et d'injection

Utiliser ce protocole pour les concentrés de stérols/stanols et les étalons de référence de phytostérols.

- a) Peser précisément 50 mg d'échantillon dans un tube à essai taré en verre (6.16). Consigner la masse exacte.
- b) Ajouter 5,00 ml de solution d'EI d'épicoprostanol à 5 mg/ml (5.9). Fermer le tube à essai de manière hermétique et mélanger avec un agitateur de type vortex (6.18).
- c) Ajouter 0,5 ml de pyridine (5.1) et 1 ml de BSTFA (5.2). Fermer le tube à essai de manière hermétique et mélanger avec un agitateur de type vortex (6.18). Il peut être requis de chauffer le tube, car certains concentrés sont fournis sous forme de granulés, qui ne se dissolvent pas à température ambiante.
- d) Transférer 300 µl de la solution échantillon dérivée, 1 ml de toluène ou d'acétate d'éthyle (5.3) et 25 mg de sulfate de sodium (5.12) dans un flacon pour passeur d'échantillons (6.17). Fermer le flacon de manière hermétique et mélanger avec un agitateur de type vortex (6.18). L'échantillon est maintenant prêt pour la séparation par chromatographie en phase gazeuse (voir Article 10).

9.3 Protocoles alcalins de 15 min et 120 min

Utiliser ce protocole pour la plupart des aliments, compléments alimentaires et concentrés d'esters de stérols/stanols.

- a) Peser précisément la prise d'essai dans un ballon à fond rond taré (6.7.1). Consigner la masse exacte.
- b) Ajouter quelques granulés régulateurs d'ébullition (6.19) et placer un manchon en PTFE (6.7.2) dans le col du ballon.
- c) Ajouter 5,00 ml de la solution d'EI d'épicoprostanol appropriée (5.9 ou 5.10).
- d) Ajouter 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium (5.6).
- e) Porter l'échantillon à ébullition à 100 °C pendant 15 min ou 120 min (voir 9.1).
- f) Retirer le ballon de la source de chaleur, insérer un bouchon (6.7.3) et laisser refroidir à température ambiante.
- g) Ajouter 7 ml d'acide chlorhydrique (5.7), insérer un bouchon (6.7.3) et agiter pour mélanger.
- h) Ajouter 40 ml de solution de chlorure de sodium (5.14), insérer un bouchon (6.7.3) et agiter pour mélanger. Laisser les deux phases se séparer. Attendre jusqu'à ce que la phase organique trouble devienne limpide avant de poursuivre.
- i) Transférer 300 µl de phase organique et 25 mg de sulfate de sodium (5.12) dans un flacon pour passeur d'échantillons (6.17).
- j) Ajouter 0,5 ml de pyridine (5.1) et 1 ml de BSTFA (5.2). Fermer le flacon de manière hermétique et mélanger avec un agitateur de type vortex (6.18). L'échantillon est maintenant prêt pour la séparation par chromatographie en phase gazeuse (voir Article 10).

9.4 Protocole acide de 45 min/alcalin de 15 min

Utiliser ce protocole pour certains aliments et compléments alimentaires contenant des esters de phytostérols ajoutés. Il est nécessaire de procéder à une hydrolyse acide avant la saponification pour garantir une libération complète des esters de phytostérols de certaines matrices, telles que certaines céréales (voir [9.1](#)).

- a) Peser précisément la prise d'essai dans un ballon à fond rond taré ([6.7.1](#)). Consigner la masse exacte.
- b) Ajouter quelques granulés régulateurs d'ébullition ([6.19](#)) et placer un manchon en PTFE ([6.7.2](#)) dans le col du ballon.
- c) Ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique ([5.7](#)).
- d) Ajouter 5,00 ml de la solution d'EI d'épicoprostanol appropriée ([5.9](#) ou [5.10](#)).
- e) Porter l'échantillon à ébullition à 100 °C pendant 45 min.
- f) Retirer le ballon de la source de chaleur, insérer un bouchon ([6.7.3](#)) et laisser refroidir à température ambiante.
- g) Ajouter 40 ml de solution de chlorure de sodium ([5.14](#)), insérer un bouchon ([6.7.3](#)) et agiter pour mélanger. Laisser les deux phases se séparer.
- h) Transférer la phase organique (sans perturber les particules solides à la surface dans la mesure du possible) dans un nouveau ballon à fond rond ([6.7.1](#)).
- i) Ajouter 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium ([5.6](#)).
- j) Porter l'échantillon à ébullition à 100 °C pendant 15 min.
- k) Retirer le ballon de la source de chaleur, insérer un bouchon ([6.7.3](#)) et laisser refroidir à température ambiante.
- l) Ajouter 7 ml d'acide chlorhydrique ([5.7](#)), insérer un bouchon ([6.7.3](#)) et agiter pour mélanger.
- m) Ajouter 40 ml de solution de chlorure de sodium ([5.14](#)), insérer un bouchon ([6.7.3](#)) et agiter pour mélanger. Laisser les deux phases se séparer. Attendre jusqu'à ce que la phase organique trouble devienne limpide avant de poursuivre.
- n) Transférer 300 µl de phase organique et 25 mg de sulfate de sodium ([5.12](#)) dans un flacon pour passeur d'échantillons ([6.17](#)).
- o) Ajouter 0,5 ml de pyridine ([5.1](#)) et 1 ml de BSTFA ([5.2](#)). Fermer le flacon de manière hermétique et mélanger avec un agitateur de type vortex ([6.18](#)). L'échantillon est maintenant prêt pour la séparation par chromatographie en phase gazeuse (voir [Article 10](#)).

10 Chromatographie en phase gazeuse

Les conditions opératoires sont présentées ci-après:

- a) température de l'injecteur: 290 °C;
- b) température du détecteur: 290 °C;
- c) température du four: 250 °C pendant 60 min, vitesse de chauffe de 15 °C/min jusqu'à 265 °C, maintien pendant 7 min.;
- d) température post-cycle: 250 °C pendant 3 min.;
- e) gaz vecteur ([6.2](#)): hydrogène ou hélium, débit constant de 1,0 ml/min.;
- f) gaz du détecteur ([6.3](#)): air, 400 ml/min, hydrogène, 30 ml/min.;