
**Détermination de la teneur en
hydroxytyrosol et tyrosol dans
les huiles d'olive vierges extra —
Chromatographie liquide à haute
performance en phase inverse
(CLHP-RP)**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Determination of hydroxytyrosol and tyrosol content in extra virgin
olive oils — Reverse phase high performance liquid chromatography
(RP-HPLC)*

[ISO/TS 23942:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9857c1be-3374-4b7d-ac3d-0371d5bc9dac/iso-ts-23942-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9857c1be-3374-4b7d-ac3d-0371d5bc9dac/iso-ts-23942-2020>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO/TS 23942:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9857c1be-3374-4b7d-ac3d-0371d5bc9dac/iso-ts-23942-2020>



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

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	3
8 Mode opératoire	3
8.1 Préparation de l'échantillon.....	3
8.2 Analyse CLHP.....	3
8.2.1 Généralités.....	3
8.2.2 Conditions de CLHP.....	3
8.2.3 Identification des pics.....	4
9 Expression des résultats	5
10 Fidélité	6
10.1 Étude de validation.....	6
10.2 Répétabilité, r	6
10.3 Reproductibilité, R	6
11 Rapport d'essai	6
Annexe A (Informative) Chromatogramme 280 nm	7
Annexe B (normative) Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)	8
Annexe C (informative) Étude de validation	9
Bibliographie	10

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*.

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 composés biophénoliques de nature sécoiridoïde et spécifiques de l'huile d'olive vierge extra (*Olea europaea* L.), sont issus de l'oleuropéine et du ligstroside et, outre leurs caractéristiques sensorielles particulières, sont associés à différents effets bénéfiques pour la santé humaine. Les composés biophénoliques contiennent deux alcools aromatiques sous forme estérifiée, à savoir l'hydroxytyrosol et le tyrosol. La méthode décrite dans le présent document repose sur une extraction de la fraction biophénolique avec une solution méthanol/eau et sur une réaction d'hydrolyse ultérieure pour produire du tyrosol libre et de l'hydroxytyrosol libre^{[1][2]}.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TS 23942:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9857c1be-3374-4b7d-ac3d-0371d5bc9dac/iso-ts-23942-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9857c1be-3374-4b7d-ac3d-0371d5bc9dac/iso-ts-23942-2020>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 23942:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9857c1be-3374-4b7d-ac3d-0371d5bc9dac/iso-ts-23942-2020>

Détermination de la teneur en hydroxytyrosol et tyrosol dans les huiles d'olive vierges extra — Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (CLHP-RP)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination quantitative de la teneur en hydroxytyrosol et tyrosol dans les huiles d'olive vierges extra par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (CLHP-RP) couplée à la détection spectrophotométrique. La méthode est également applicable à toutes les autres huiles d'olive de catégorie commerciale différente.

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

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:

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

3.1

hydroxytyrosol et tyrosol

alcools aromatiques présents sous forme libre ou liée dans l'huile d'olive vierge extra, spécifiques de l'espèce *Olea europaea* L.

4 Principe

L'hydroxytyrosol et le tyrosol, présents sous forme libre et sous forme estérifiée, sont extraits de l'huile avec une solution méthanol/eau puis soumis à une réaction d'hydrolyse avec une solution éthanolique à 10 % d'acide sulfurique. Les composés sont identifiés par CLHP et par détection spectrophotométrique à 280 nm. La quantité d'alcools aromatiques libres est calculée par étalonnage externe.

5 Réactifs

Pendant l'analyse, sauf mention contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Acide orthophosphorique, d'une fraction volumique de 85 %.

5.2 Méthanol de qualité chromatographique.

5.3 Acétonitrile de qualité chromatographique.

5.4 Eau de qualité chromatographique.

5.5 **Éthanol**, d'une fraction volumique de 96 %.

5.6 **Acide sulfurique**, d'une fraction volumique de 96 %.

5.7 **Solution méthanol/eau**, 80/20 V/V.

5.8 **Échantillon de référence: hydroxytyrosol ou 2-(3,4-Dihydroxyphényl)éthanol**, par exemple Extrasynthese, (Cedex, France)¹⁾.

5.9 **Échantillon de référence: tyrosol**, par exemple Sigma Aldrich (Allemagne)¹⁾.

5.10 **Solution d'étalonnage externe d'hydroxytyrosol et de tyrosol**

Préparer la solution d'étalonnage externe d'hydroxytyrosol et de tyrosol comme suit.

Peser exactement, à 0,1 mg près, environ 25 mg d'hydroxytyrosol (5.8) et de tyrosol (5.9) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.2) et compléter au volume avec une solution méthanol/eau 80/20 V/V (5.7). Transvaser 1 ml de cette solution dans une autre fiole de 10 ml et compléter au volume avec la même solution méthanol/eau 80/20 V/V (5.7). La concentration finale sera de 50 mg/l pour chaque étalon externe. Injecter 20 µl de cette solution dans le système CLHP. La solution est stable pendant au moins six mois à -20 °C.

5.11 **Solution d'hydrolyse**, constituée d'éthanol/eau/acide sulfurique 50/40/10 V/V/V.

6 **Appareillage**

Verrerie de laboratoire habituelle et éléments suivants.

6.1 **Balance analytique** précise à ± 0,1 mg.

6.2 **Fioles jaugées de 10 ml et 50 ml**, de classe A.

6.3 **Pipette électronique de 1 000 µl et 5 000 µl ou pipette manuelle.**

6.4 **Tube à essai de 10 ml**, avec bouchon à vis.

6.5 **Mélangeur**, de type Vortex.

6.6 **Bain d'extraction à ultrasons.**

6.7 **Filtres seringues en PVDF (polyfluorure de vinylidène)**, 0,45 µm, 13 mm.

6.8 **Centrifugeuse** pouvant tourner à 5 000 r/min.

6.9 **Seringue en plastique de 5 ml.**

6.10 **Bain thermostatique.**

1) Extrasynthese (Cedex, France) et Sigma Aldrich (Allemagne) sont des exemples de sociétés fabriquant des produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits.

6.11 Système analytique, comprenant une pompe ternaire de CLHP avec système de dégazage équipée d'une colonne de CLHP, en phase inverse RP 18. La colonne suivante s'est avérée adaptée à la détermination (diamètre interne 4,6 mm, longueur 25 cm, granulométrie 5 µm, 100 Å, type Spherisorb ODS2²⁾) avec un détecteur spectrophotométrique UV à 280 nm et un système d'intégration. Un détecteur à barrettes de photodiodes (PDA) pour l'enregistrement des spectres peut être utilisé pour faciliter l'identification des pics, en faisant correspondre les spectres d'hydroxytyrosol et de tyrosol dans l'échantillon avec les spectres de la solution d'étalonnage externe.

Un système d'analyse et d'intégration des données est nécessaire.

7 Échantillonnage

Il est important de fournir au laboratoire un échantillon d'huile intact, non endommagé ou non modifié pendant le transport ou le stockage. Un échantillon représentatif doit être utilisé pour l'analyse. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée dans l'ISO 5555.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon

À l'aide d'une balance analytique (6.1), peser 2 g d'huile bien homogénéisée dans un tube à essai conique de 10 ml (6.4). Ajouter, à l'aide d'une pipette (6.3), 5 ml de solution méthanol/eau 80/20 V/V (5.7). Mélanger la solution à l'aide d'un mélangeur pour tube à essai de type Vortex (6.5) pendant 1 min et poursuivre l'extraction pendant 15 min dans un bain à ultrasons (6.6) à température ambiante. Centrifuger (6.8) à 5 000 r/min pendant 25 min. Filtrer une portion aliquote à travers un filtre seringue à membrane en PVDF (6.7). Transférer, à l'aide d'une pipette (6.3), 1 ml de la solution filtrée dans un autre tube à essai de 10 ml (6.4) et sécher totalement dans un bain thermostatique (6.10) à une température maximale de 40 °C sous un courant d'azote. Ajouter 1 ml de la solution d'hydrolyse (5.11) et mélanger, puis laisser réagir à 40 °C pendant 1 h. Laisser la solution toute une nuit à température ambiante. Filtrer ensuite la solution à l'aide d'un filtre seringue à membrane en PVDF (6.7).

8.2 Analyse CLHP

8.2.1 Généralités

Injecter 20 µl de l'échantillon dans le système de CLHP (6.11). Le premier échantillon injecté dans une série d'analyse doit être un blanc de solution méthanol/eau 80/20 V/V (5.7). Aucun signal interférent ne doit être présent pendant l'analyse chromatographique au même temps de rétention de l'hydroxytyrosol et du tyrosol.

8.2.2 Conditions de CLHP

Les conditions de fonctionnement indiquées dans le [Tableau 1](#) se sont avérées adaptées à la détermination.

2) La colonne Spherisorb ODS2 est un exemple de colonne chromatographique appropriée et disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.