

PROJET DE NORME INTERNATIONALE

ISO/DIS 7358

ISO/TC 54

Secrétariat: UNE

Début de vote:
2020-04-01

Vote clos le:
2020-06-24

Huiles essentielles de bergamote, de citron, de bigarade et de limette complètement ou partiellement privées de bergaptène — Détermination de la teneur en bergaptène par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Essential oils of bergamot, lemon, bitter orange and lime, fully or partially reduced in bergapten — Determination of bergapten content by high-performance liquid chromatography (HPLC)

ICS: 71.100.60

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/DIS 7358](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cd98e3c-7419-4e59-ab1c-fb622eae8fcc/iso-dis-7358>

CE DOCUMENT EST UN PROJET DIFFUSÉ POUR OBSERVATIONS ET APPROBATION. IL EST DONC SUSCEPTIBLE DE MODIFICATION ET NE PEUT ÊTRE CITÉ COMME NORME INTERNATIONALE AVANT SA PUBLICATION EN TANT QUE TELLE.

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.

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.

Le présent document est distribué tel qu'il est parvenu du secrétariat du comité.



Numéro de référence
ISO/DIS 7358:2020(F)

© ISO 2020

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/DIS 7358

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cd98e3c-7419-4e59-ab1c-fb622eae8fcc/iso-dis-7358>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en oeuvre, 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, Geneva
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Website: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire	Page
Avant-propos	4
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	1
4 Réactifs	1
5 Appareillage et équipement	2
5.1 Matériel courant de laboratoire	2
5.2 Système de CLHP, composé des éléments suivants	3
6 Préparation de l'échantillon pour essai	3
7 Mode opératoire	3
7.1 Conditions opératoires	3
7.2 Détermination	3
7.2.1 CLHP en phase normale	3
7.2.2 CLHP en phase inverse	5
8 Calculs	8
8.1 CLHP en phase normale ou inverse	8
8.1.1 Méthode de l'étalon interne	8
8.1.2 Méthode de l'étalon externe	8
9 Fidélité	9
9.1 Répétabilité	9
10 Rapport d'essai	9
Annexe A (informative) Chromatogramme type de l'analyse par chromatographie liquide haute performance de composés de référence dans une phase inverse	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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées et maintenues conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, 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/CEI, 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 brevet. L'ISO ne saurait être tenue responsable d'identifier de tels droits de brevets. Les détails des droits de brevet identifiés lors de l'élaboration du document seront dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/patents).

Tout nom de marque utilisé dans ce document est fourni pour la commodité des utilisateurs et ne constitue pas une approbation.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, 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'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien www.iso.org/iso/foreword.html.

Le comité technique chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 54, *Huiles essentielles*.

Cette seconde édition annule et remplace la première édition (ISO 7358:2002), qui a fait l'objet d'une révision technique avec l'ajout d'une méthode alternative utilisant une colonne en phase inverse.

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/members.html.

Huiles essentielles de bergamote, de citron, de bigarade et de limette complètement ou partiellement privées de bergaptène — Détermination de la teneur en bergaptène par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode d'analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP), avec utilisation soit d'un étalon interne, soit d'un étalon externe, pour la détermination de la teneur en bergaptène des huiles essentielles de bergamote [*Citrus aurantium* ssp. bergamia (Risso et Poit.) Wight et Arn. ex Engl.], de citron [*Citrus limon* (L.) Burm. f.], de bigarade (*Citrus bigaradia* Risso) et de limette [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle et *Citrus latifolia* Tanaka], complètement ou partiellement privées de bergaptène.

2 Références normatives

Les documents suivants sont donnés en référence dans le texte de façon à ce qu'une partie ou la totalité de leur contenu constitue 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 normatif de référence (y compris ses amendements) s'applique.

ISO 356, *Huiles essentielles — Préparation des échantillons pour essai*

ISO 8432:1987, *Huiles essentielles — Analyse par chromatographie liquide haute performance — Méthode générale*

3 Principe

Les teneurs en bergaptène des échantillons à doser sont déterminées après dilution par chromatographie liquide haute performance en phase inverse ou par chromatographie liquide haute performance en phase normale avec gradient d'élution, par une méthode de standardisation interne ou externe et une détection par spectromètre UV à barrettes de diodes.

4 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

4.1 Substance de référence : bergaptène (5-Méthoxyypsoralène), $C_{12}H_8O_4$, masse molaire = 216,19 g/mol de pureté connue ≥ 95 %.

4.2 Étalon interne : coumarine (1-Benzopyran-2-one), $C_9H_6O_2$, masse molaire = 146,14 g/mol de pureté connue ≥ 98 %.

4.3 Solvants

4.3.1 Solvants pour la chromatographie liquide haute performance en phase normale

4.3.1.1 Chloroforme, de pureté analytique, contenant moins de 2 % (fraction volumique) d'éthanol, à utiliser lors de la préparation de l'échantillon d'huile essentielle contenant du bergaptène, l'étalon interne et la phase mobile.

4.3.1.2 Hexane, de qualité CLHP, à utiliser dans la phase mobile (4.3.1.4).

4.3.1.3 Acétate d'éthyle, de qualité CLHP, à utiliser dans la phase mobile (4.3.1.4).

4.3.1.4 Phase mobile

Les solvants utilisés pour la phase mobile doivent être de qualité compatible avec le système de détection utilisé, et préparés en quantité suffisante pour l'ensemble de l'analyse. Préparer, à titre indicatif, un des mélanges suivants :

4.3.1.4.1 Hexane (4.3.1.2) **et acétate d'éthyle** (4.3.1.3), mélangés dans un rapport volumique de 80:20.

4.3.1.4.2 Hexane (4.3.1.2) **et chloroforme** (4.3.1.1), mélangés dans un rapport volumique de 85:15.

4.3.2 Solvants pour la chromatographie liquide haute performance en phase inverse

Le solvant utilisé pour la phase mobile est un-mélange ternaire préparé à partir de ces trois solvants ci-dessous, comme décrit dans le Tableau 1 (voir 7.2.2.3.1).

4.3.2.1 Eau distillée, de qualité CLHP, à utiliser dans la phase mobile (7.2.2.3.1).

4.3.2.2 Acétonitrile, de qualité CLHP, à utiliser dans la phase mobile (7.2.2.3.1).

4.3.2.3 Méthanol, à utiliser dans la phase mobile (7.2.2.3.1).

4.3.2.4 Solvant de dilution, **méthanol** (4.3.2.3) **et d'acétonitrile** (4.3.2.2) mélangés dans un rapport volumique de 80:20.

5 Appareillage et équipement

5.1 Matériel courant de laboratoire

5.1.1 Fioles jaugées : 100 ml, 50 ml, 10 ml

5.1.2 Pipettes Pasteur ; pipettes jaugées : 1 ml, 5 ml, 10 ml et 20 ml ; micropipette : 500 µl

5.1.3 Seringues à usage unique : 5 ml

5.1.4 Filtre PTFE : 0,45 µm

5.1.5 Vials pour injection en CLHP

5.1.6 Balance de précision

5.2 Système de CLHP, composé des éléments suivants

5.2.1 Chromatographe pour phase liquide

5.2.2 Colonne pour chromatographie liquide haute performance en phase normale, en acier inoxydable, d'une longueur comprise entre 150 mm et 250 mm, de diamètre intérieur compris entre 4 mm et 5 mm et garnie d'une phase stationnaire de silice granulée de qualité CLHP, présentant une granulométrie voisine de 5 µm.

5.2.3 Colonne pour chromatographie liquide haute performance en phase inverse, en acier inoxydable, d'une longueur de 150 mm (ou 250 mm), de diamètre intérieur de 4, 6 mm et garnie d'une phase stationnaire de type C:18 présentant une granulométrie voisine de 3,5 µm (ou 5 µm), par exemple Zorbax Eclipse Plus C:18: 3,5 µm (4,6 × 150) mm d'Agilent ou équivalent.

5.2.4 Système à pompe ternaire permettant la programmation de gradients de solvants

5.2.5 Système de dégazage des solvants (facultatif), par exemple une cuve à ultrasons.

5.2.6 Système de détection, pouvant être réglé à des longueurs d'ondes de 254 nm ou de 312 nm, ou spectromètre UV à barrettes de diodes.

5.2.7 Enregistreur et intégrateur (facultatif), compatibles avec l'ensemble du système de CLHP.

6 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 356.

Dissoudre les éventuels dépôts solides en les chauffant modérément.

7 Mode opératoire

7.1 Conditions opératoires

Régler le débit de la phase mobile (4.3.1.4) de façon que les pics correspondant au bergaptène et à la coumarine soient nettement séparés des autres constituants de l'huile essentielle détectables par le détecteur à UV (5.2.6). Typiquement, le débit se situe entre 1 ml/min et 1,5 ml/min.

Suivre le mode opératoire spécifié dans l'ISO 8432.

7.2 Détermination

7.2.1 CLHP en phase normale

7.2.1.1 Méthode de l'étalon interne

7.2.1.1.1 Optimisation des conditions chromatographiques pour CLHP en phase normale

7.2.1.1.1.1 Séparation

Vérifier sur les chromatogrammes obtenus que le bergaptène est bien séparé des autres constituants de l'huile essentielle. Vérifier en outre que la coumarine (4.2) utilisée comme étalon interne ne masque pas, ni ne coïncide avec, un quelconque constituant de l'huile essentielle. Déterminer les temps de rétention du bergaptène et de la coumarine.

7.2.1.1.1.2 Quantité d'étalon interne

La quantité de coumarine (étalon interne) ajoutée à l'échantillon est considérée comme adéquate lorsque les aires de pic du bergaptène (dans l'huile essentielle) et de la coumarine sont approximativement égales sur les chromatogrammes. Pour déterminer cette quantité, injecter dans le CLHP une solution (par exemple 10 µl) contenant une quantité connue (par exemple 10 mg) de coumarine (4.2) dissoute dans du chloroforme (4.3.1.1, par exemple 10 ml). Ensuite, injecter le même volume d'une solution de l'huile essentielle à doser dissoute dans du chloroforme (4.3.1.1). Ajuster la concentration en masse de ces deux solutions de manière à obtenir des aires de pic comparables.

7.2.1.1.2 Coefficient de réponse K

Préparer une solution d'étalonnage comme suit. Dans une fiole jaugée (5.1.1) de capacité appropriée, peser, à 0,1 mg près, environ 20 mg de coumarine (4.2). Dans la même fiole jaugée, peser, à 0,1 mg près, environ 10 mg de bergaptène (4.1), puis dissoudre les deux composés dans environ 20 ml de chloroforme (4.3.1.1).

Injecter une quantité adéquate (voir 7.2.1.1) de la solution d'étalonnage de façon à rester dans les limites de la gamme de sensibilité du détecteur.

Mesurer les aires des pics du chromatogramme. Un chromatogramme type des substances de référence est donné dans l'Annexe A.

Calculer le coefficient de réponse K à l'aide de l'équation (1) :

$$K = \frac{m_R \cdot A_{IS}}{m_{IS} \cdot A_R} \tag{1}$$

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

où

- m_R est la masse, en milligrammes, du bergaptène (substance de référence) (4.1) ajouté à la solution ;
- m_{IS} est la masse, en milligrammes, de la coumarine (étalon interne) (4.2) ajoutée à la solution ;
- A_R est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant au bergaptène (substance de référence) (4.1) ;
- A_{IS} est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la coumarine (étalon interne) (4.2).

NOTE Dans l'ISO 8432, cette équation équivaut à la présentation suivante :

$$K = \frac{m_R A_E}{m_E A_R}$$

où

- m_R est la masse, en milligrammes, du bergaptène (substance de référence) (4.1) ajouté à la solution ;
- m_E est la masse, en milligrammes, de la coumarine (étalon interne) (4.2) ajoutée à la solution ;
- A_R est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant au bergaptène (substance de référence) (4.1) ;
- A_E est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la coumarine (étalon interne) (4.2).

7.2.1.1.3 Dosage du bergaptène

Dans une fiole jaugée (5.1.1) de capacité appropriée (par exemple 15 ml), préparer la solution pour essai. Peser, à 0,1 mg près, une quantité adéquate de coumarine (m_{IS}) (environ 10 mg), comme déterminée en 7.2.2.1, et une quantité d'huile essentielle (m_s), de façon à obtenir un chromatogramme dans lequel l'aire du pic correspondant au bergaptène est sensiblement égale à celle correspondant au pic de la coumarine.

Ajouter du chloroforme (4.3.1.1, environ 8 ml) et agiter soigneusement pour dissoudre la coumarine.

La teneur en bergaptène des huiles essentielles varie d'un échantillon à l'autre, selon que l'échantillon est complètement ou partiellement privé de bergaptène. Par conséquent, il peut être nécessaire de préparer plusieurs dilutions de la solution pour essai, de façon à obtenir un chromatogramme présentant des aires des pics du bergaptène et de la coumarine comparables. De ce fait, pour le dosage, choisir la dilution la plus appropriée répondant à cette exigence.

Dans les mêmes conditions opératoires de CLHP que celles établies en 7.2.1.1.1, injecter une quantité adéquate de la solution pour essai de façon à rester dans les limites de la gamme de sensibilité du détecteur.

Mesurer les aires des pics du chromatogramme.

Mesurer et consigner les aires des pics du chromatogramme correspondant au bergaptène (A_x) et à la coumarine (A_{IS}).

7.2.1.2 Méthode de l'étalon externe

Suivre le mode opératoire spécifié dans l'ISO 8432 relatif à la méthode de l'étalon externe.

7.2.2 CLHP en phase inverse

7.2.2.1 Préparation des solutions de référence destinées à l'étalonnage :

Pour chaque étalonnage, les solutions étalons doivent être préparées à partir de solutions mères de bergaptène et de coumarine, conservées dans un endroit frais à 4 °C.

7.2.2.1.1 Solutions mères

Dans une fiole de 100 ml, peser exactement environ 50 mg de bergaptène et compléter jusqu'au trait de jauge avec le solvant de dilution. Homogénéiser la solution et la laisser 3 min dans le bac à ultrasons. Cette solution mère est environ exactement à 500 mg/l en bergaptène.

Dans une fiole de 100 ml, peser exactement environ 50 mg de coumarine dans un flacon de 50 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec le solvant d'élution. Homogénéiser la solution et la laisser 3 min dans le bac à ultrasons. Cette solution mère est environ exactement à 1 000 mg/l de coumarine.

7.2.2.1.2 Solutions filles

À partir des solutions mères, préparer une gamme étalon de 8 points de calibration-de concentration en bergaptène suivantes : 1 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l et 200 mg/l.

- 1 mg/l de solution étalon : dans une fiole de 50 ml, transférer 100 µl de solution mère de bergaptène et 5 ml de solution mère de coumarine puis compléter jusqu'au trait de jauge avec le solvant de dilution.
- 2,5 mg/l de solution étalon : dans une fiole de 50 ml, transférer 250 µl de solution mère de bergaptène et 5 ml de solution mère de coumarine puis compléter jusqu'au trait de jauge avec le solvant de dilution.