

---

---

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

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

[ISO 23942:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fa9b6692-07c6-4d9e-86e3-82a0fb870b67/iso-23942-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fa9b6692-07c6-4d9e-86e3-82a0fb870b67/iso-23942-2022>



iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 23942:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fa9b6692-07c6-4d9e-86e3-82a0fb870b67/iso-23942-2022>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2022

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction .....	v
<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>2</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>3</b>
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
<b>9</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>5</b>
<b>10</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>6</b>
10.1   Étude de validation .....	6
10.2   Répétabilité, $r$ .....	6
10.3   Reproductibilité, $R$ .....	6
<b>11</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>6</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Chromatogramme 280 nm</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe B</b> (normative) <b>Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe C</b> (informative) <b>Études de validation</b> .....	<b>9</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>13</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 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](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.

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](http://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*.

Cette première édition annule et remplace l'ISO/TS 23942:2020, qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- conversion d'une Spécification technique en une Norme internationale;
- ajout d'études de validation supplémentaires à l'[Annexe C](#).

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](http://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<sup>[1][2]</sup>.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 23942:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fa9b6692-07c6-4d9e-86e3-82a0fb870b67/iso-23942-2022>



# Détermination de la teneur en hydroxytyrosol et tyrosol dans les huiles d'olive vierges extra — Méthode par 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 <https://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)<sup>1)</sup>.

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

**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

La verrerie de laboratoire habituelle et les éléments suivants doivent être utilisés.

**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 tr/min.

---

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.



## 6.9 Seringue en plastique de 5 ml.

## 6.10 Bain thermostatique.

**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 ODS2<sup>2))</sup> avec détecteur spectrophotométrique UV à 280 nm et 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 l'étalon 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<sup>[3]</sup>.

## 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 tr/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° 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. D'autres colonnes peuvent être utilisées, notamment les colonnes appropriées pour un système ultra-CLHP (UCLHP), si les conditions de fonctionnement du [Tableau 1](#) sont ajustées et si les paramètres des données de fidélité sont identiques ou supérieurs à ceux indiqués dans les [Tableaux C.3, C.4](#) et [C.5](#). 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.

Tableau 1 — Conditions de fonctionnement

Temps min	Débit ml/min	A %	B %	C %
0	1,00	96	2	2
40	1,00	50	25	25
45	1,00	40	30	30
60	1,00	0	50	50
70	1,00	0	50	50
72	1,00	96	2	2
82	1,00	96	2	2

**Légende**  
A = eau contenant 0,2 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
B = méthanol  
C = acétonitrile

Le gradient ternaire est programmé pour pouvoir observer, dans l'ensemble du chromatogramme, que l'hydrolyse est complète avec l'absence de formes composées restant dans l'extrait. Pour déterminer si l'hydrolyse est complète, le chromatogramme de l'échantillon d'huile hydrolysée est comparé à celui de l'échantillon d'huile extraite qui n'a pas été hydrolysée, injecté dans les mêmes conditions d'analyse. Étant donné que l'acétonitrile et le méthanol sont toujours utilisés selon le même rapport de concentration, un système binaire peut également être employé. Une fois que les opérateurs se sont familiarisés avec l'analyse, le temps d'éluion peut être réduit en arrêtant le gradient après l'éluion du tyrosol, puis en lavant la colonne pendant 10 min avec des solvants B/C selon un rapport de 50/50 V/V et enfin en reconditionnant pendant 10 min avec des solvants A/B/C 96/2/2 V/V/V.

Le détecteur spectrophotométrique (280 nm) doit être mis en marche une heure avant la première analyse. La colonne de CLHP doit être conditionnée au moins 15 min avant le début du gradient avec le solvant de départ T = 0. Pour commencer, injecter 20 µl de solution d'étalonnage externe (5.10) et, dès que l'analyse est terminée, injecter 20 µl de la solution d'essai extraite (voir 8.1).

Deux déterminations indépendantes doivent être effectuées sur le même échantillon. Les résultats doivent respecter les valeurs de répétabilité pour un certain niveau de concentration. Le résultat est la moyenne des deux déterminations indépendantes.

À la fin de la journée, le système doit être conditionné avec un mélange méthanol/acétonitrile 50/50 V/V à un débit de 1 ml/min pendant au moins 15 min. Fermer les extrémités de la colonne chromatographique avant de la stocker.

Un exemple de chromatogramme est illustré à la [Figure A.1](#).

### 8.2.3 Identification des pics

L'identification des pics est effectuée d'après les temps de rétention par une comparaison avec la solution d'étalonnage externe de composition connue en hydroxytyrosol et tyrosol qui sont élués dans l'ordre suivant: hydroxytyrosol, tyrosol (voir [Annexe A](#)).

## 9 Expression des résultats

Calculer les aires des deux pics identifiés à l'aide d'un intégrateur électronique, en mg/kg, d'après les [Formules \(1\)](#) et [\(2\)](#):

$$H = \frac{(A_{H\_échantillon}) \times 250 \times (C_H)}{(A_H) \times m} \quad (1)$$

où

$H$  est la teneur en hydroxytyrosol;

$A_{H\_échantillon}$  est l'aire correspondant au pic d'hydroxytyrosol de l'échantillon enregistré à 280 nm;

$A_H$  est l'aire correspondant au pic d'hydroxytyrosol de l'étalon externe enregistré à 280 nm;

250 est le facteur de multiplication utilisé pour exprimer le résultat, en mg/kg, en tenant compte d'un volume d'extraction final de 5 ml et d'un volume d'injection de 20  $\mu$ l;

$C_H$  est la quantité, en  $\mu$ g, d'hydroxytyrosol injecté sous forme d'étalon externe;

$m$  est la masse initiale de l'échantillon, en grammes.

$$T = \frac{(A_{T\_échantillon}) \times 250 \times (C_T)}{(A_T) \times m} \quad (2)$$

où

$T$  est la teneur en tyrosol;

$A_{T\_échantillon}$  est l'aire correspondant au pic de tyrosol de l'échantillon enregistré à 280 nm;

$A_T$  est l'aire correspondant au pic de tyrosol de l'étalon externe enregistré à 280 nm;

250 est le facteur de multiplication utilisé pour exprimer le résultat, en mg/kg, en tenant compte d'un volume d'extraction final de 5 ml et d'un volume d'injection de 20  $\mu$ l;

$C_T$  est la quantité, en  $\mu$ g, de tyrosol injecté sous forme d'étalon externe;

$m$  est la masse initiale de l'échantillon, en grammes.

La teneur totale est indiquée par la somme de la teneur des deux composés, comme indiqué par la [Formule \(3\)](#):

$$S = \Sigma (H + T) \quad (3)$$

où  $S$  est la teneur totale en composés biophénoliques.

Exprimer ce résultat sans chiffres après la virgule.

Les autres pics apparaissant dans le chromatogramme ne doivent pas être pris en compte.