
**Corps gras d'origines animale et
végétale — Détermination des teneurs
en tocophérols et en tocotriénols par
chromatographie en phase liquide à
haute performance**

*Animal and vegetable fats and oils — Determination of tocopherol
and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography*

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2016, 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
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 Préparation de l'échantillon pour essai	3
9 Mode opératoire	4
9.1 Préparation des solutions d'étalonnage	4
9.1.1 Solutions étalons mères	4
9.1.2 Solution étalon	4
9.2 Optimisation des paramètres de travail	5
9.3 Préparation de la solution d'essai	5
9.4 Détermination	6
10 Expression des résultats	6
11 Fidélité	7
11.1 Essai interlaboratoires	7
11.2 Répétabilité	7
11.3 Reproductibilité	7
12 Rapport d'essai	7
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes	9
Annexe B (informative) Saponification	11
Annexe C (informative) Résultats des essais interlaboratoires	13
Bibliographie	17

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 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).

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 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: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'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 9936:2006), qui a fait l'objet d'une révision technique. Elle incorpore également l'Amendement ISO 9936:2006/Amd.1:2011 et le Rectificatif technique ISO 9936:2006/Cor.1:2008. Un énoncé relatif à la non applicabilité au lait et aux produits laitiers a été ajouté au Domaine d'application.

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols par chromatographie en phase liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour la détermination des teneurs en α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols libres (appelés globalement tocots) des graisses et des huiles (appelés corps gras dans la suite du texte) d'origines animale et végétale, par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP).

Pour les produits contenant des esters de tocophérols ou de tocotriénols, il est nécessaire qu'ils subissent une saponification préalable.

Le lait et les produits laitiers (ou les corps gras issus du lait et des produits laitiers) sont exclus du domaine d'application de la présente Norme internationale.

NOTE Une méthode appropriée incluant un protocole de saponification à froid est décrite, pour information uniquement, dans l'[Annexe B](#).

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application 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.

3.1

teneur en tocol

fraction massique des différents tocots, déterminée suivant la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

Note 1 à l'article: Cette teneur est exprimée en milligrammes par kilogramme, en nombre entier.

4 Principe

Une prise d'essai est dissoute dans du *n*-heptane et les différents tocots sont séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP). La teneur de chaque tocol est calculée à l'aide de facteurs d'étalonnage déterminés à partir de solutions étalons.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité CLHP ou équivalente.

5.1 Étalons α -, β -, γ - et δ -tocophérol et -tocotriénol.

Si l'on ne dispose pas d'étalons pour les tocophérols, il est possible d'utiliser un mélange d'huile de germe de blé et d'huile de soja pour identifier les α -, β -, γ - et δ -tocophérols.

Si l'on ne dispose pas d'étalons pour les tocotriénols, il est possible d'utiliser de l'huile de palme pour identifier les α - et γ -tocotriénols. Les chromatogrammes obtenus peuvent aider à l'identification des pics sur les chromatogrammes des échantillons pour essai, auquel cas il convient d'utiliser les facteurs d'étalonnage correspondant aux différents tocophérols.

NOTE Les étalons α -, β -, γ - et δ -tocophérol et tocotriénol peuvent être obtenus auprès de Merck¹⁾; α -tocophérol étant disponible auprès de différents fournisseurs. Les étalons tocotriénol peuvent être obtenus auprès de Sigma Aldrich²⁾. Une certaine variabilité de la pureté des étalons du commerce, qui peut aller de 85 % à 100 %, a été signalée dans plusieurs cas. Il est par conséquent important de déterminer la concentration des solutions d'étalonnage préparées par spectrométrie UV (voir 9.1.1).

5.2 Tétrahydrofuranne, filtré à travers un filtre en nylon pour CLHP (0,45 μ m).

5.3 *n*-Heptane, filtré à travers un filtre en nylon pour CLHP (0,45 μ m).

5.4 Phase mobile de la CLHP.

Il convient d'utiliser tout mélange approprié de solvants atteignant une résolution chromatographique des pics aussi bonne que celle présentée dans le [Tableau 2](#) (temps de rétention relatifs des tocophérols et des tocotriénols) et dans l'[Annexe A](#) (chromatogrammes d'un mélange d'huiles végétales) (voir [Tableau C.3](#)).

Une bonne séparation du γ -tocophérol et du β -tocotriénol peut être obtenue à l'aide d'un mélange 5 % méthyl *t*-butyl éther (fraction volumique) + 95 % *n*-heptane (fraction volumique) et d'une colonne de silice greffée par des groupements diols.

La préparation d'une phase mobile appropriée, solution à 3,85 % (fraction volumique) de tétrahydrofuranne dans le *n*-heptane, est indiquée ici. À l'aide d'une éprouvette graduée de 1 000 ml (6.5), introduire 1 000 ml de *n*-heptane (5.3) dans un flacon de 2 l. Ajouter deux fois 20 ml de tétrahydrofuranne (5.2) à l'aide d'une pipette jaugée de 20 ml (6.6). Homogénéiser la phase mobile en la plaçant pendant 15 min dans un bain à ultrasons (6.8).

5.5 Méthanol.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

1) Le mélange commercial de tocophérols Merck 613424 est disponible auprès de Calbiochem (www.calbiochem.com). Il se compose de flacons contenant chacun 50 mg de DL- α -tocophérol, D- β -tocophérol, D- γ -tocophérol et D- δ -tocophérol d'une pureté de 95 % par CLHP (pour chaque composant). Le mélange commercial de tocotriénols Merck 613432 est également disponible auprès de Calbiochem. Il se compose de flacons contenant chacun 50 mg de α -tocotriénol, β -tocotriénol, γ -tocotriénol et δ -tocotriénol d'une pureté de 95 % par CLHP (75 % pour le γ -tocotriénol). 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 des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

2) Les tocotriénols sont disponibles auprès de Sigma Aldrich (www.sigmaaldrich.com) et de Chromadex (www.chromadex.com) avec des puretés comprises entre 65 % et 98 %. 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 des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

6.1 Système CLHP, comprenant une pompe haute-pression, un dispositif d'injection de l'échantillon, un chauffe-colonne réglé sur 25 °C (facultatif), un fluorimètre dont la longueur d'onde d'excitation est réglée sur 295 nm et la longueur d'onde d'émission sur 330 nm, et un intégrateur enregistreur.

Si l'on ne dispose pas d'un fluorimètre, il est admis, mais non recommandé, d'utiliser un détecteur UV. Toutefois, si un détecteur à UV est utilisé, il convient de régler sa longueur d'onde sur 292 nm.

6.2 Colonne analytique pour CLHP, deux types sont possibles:

- colonne de 250 mm × 4 mm, garnie de microparticules de **silice greffée par des groupements diols** d'un diamètre moyen de 5 µm environ, ou
- colonne de 250 mm × 4,6 mm, garnie de microparticules de **silice** d'un diamètre moyen de 5 µm environ.

NOTE 1 Le LiChrospher 100 Diol (diamètre de 5 µm) disponible dans le commerce convient pour le garnissage de la colonne de silice greffée par des groupements diols, le LiChrosob SI 60 et le Kromasil 100³⁾ également disponibles dans le commerce convenant pour le garnissage de la colonne de silice. Si l'on s'attend à la présence de β-tocotriénol dans l'échantillon, il convient de choisir la colonne de silice greffée par des groupements diols car le γ-tocophérol et le β-tocotriénol sont coélus en cas d'utilisation de la colonne de silice.

NOTE 2 La longueur et le diamètre de la colonne peuvent être adaptés en fonction de la technique CLHP employée.

NOTE 3 Les deux types de colonnes ont été utilisés pour évaluer les données de fidélité ([Annexe C](#)).

6.3 Spectromètre UV, permettant le mesurage absolu de l'absorbance à des longueurs d'onde définies avec précision, avec une cellule de 10 mm de longueur de trajet.

6.4 Évaporateur rotatif.

6.5 Éprouvette graduée, d'une capacité de 1 000 ml.

6.6 Pipettes jaugées, d'une capacité de 5 ml, 10 ml et 20 ml.

6.7 Fioles jaugées, d'une capacité de 50 ml et 25 ml.

6.8 Bain à ultrasons.

7 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire et 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 la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée dans l'ISO 5555.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Dans le cas d'échantillons pour laboratoire liquides, préparer l'échantillon pour essai par homogénéisation, comme décrit dans l'ISO 661. Il convient toutefois d'omettre la filtration.

Dans le cas d'échantillons solides, placer une portion représentative (c'est-à-dire au moins égale à 10 % en masse de l'échantillon pour laboratoire) dans un bécher en verre et homogénéiser soigneusement

3) Ces types de colonnes sont des 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 des produits ainsi désignés.