

TC 34

NORME INTERNATIONALE 5508

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Corps gras d'origines animale et végétale — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras

Animal and vegetable fats and oils — Analysis by gas-liquid chromatography of methyl esters of fatty acids

Première édition — 1978-10-15

CDU 664.3 : 661.73 : 543,544,45

Réf. n° : ISO 5508-1978 (F)

Descripteurs : corps gras, corps gras animal, corps gras végétal, huile végétale, acide gras, ester méthylique, analyse quantitative, analyse qualitative, méthode chromatographique en phase gazeuse.

Prix basé sur 5 pages

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 confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 5508 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en juillet 1976.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

Afrique du Sud, Rép. d'	Espagne	Pologne
Allemagne, R.F.	France	Portugal
Australie	Hongrie	Royaume-Uni
Autriche	Iran	Tchécoslovaquie
Bulgarie	Israël	Thaïlande
Canada	Nouvelle-Zélande	Turquie
Corée, Rép. de	Pays-Bas	Yougoslavie

Le comité membre du pays suivant l'a désapprouvée pour des raisons techniques :

Chili

Corps gras d'origines animale et végétale — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente Norme internationale donne des directives générales pour la détermination par chromatographie en phase gazeuse de la composition qualitative et quantitative d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras obtenu selon l'ISO 5509.

La méthode n'est pas applicable aux acides gras polymérisés.

2 RÉFÉRENCE

ISO 5509, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation des esters méthyliques d'acides gras.*

3 PRODUITS NÉCESSAIRES

3.1 Gaz vecteur

Gaz inerte (azote, hélium, argon, etc.) soigneusement desséché et contenant moins de 10 mg/kg d'oxygène.

3.2 Gaz auxiliaires

3.2.1 Hydrogène (de pureté $\geq 99,9\%$), ne contenant pas d'impuretés organiques.

3.2.2 Air ou oxygène, ne contenant pas d'impuretés organiques.

3.3 Produits d'étalonnage

Mélange d'esters méthyliques, ou esters méthyliques d'une

huile, de composition connue, si possible voisine de celle du corps gras à analyser.

4 APPAREILLAGE

Les prescriptions fournies concernent les appareillages usuels de chromatographie en phase gazeuse avec colonne à remplissage et détecteur à ionisation de flamme. Tout appareillage ayant la même efficacité et la même résolution que celles définies en 5.1.2 peut convenir.

4.1 Appareil de chromatographie en phase gazeuse

4.1.1 Dispositif d'injection

Le dispositif d'injection doit avoir le plus faible volume mort possible. Il sera de préférence capable d'être porté à une température supérieure de 20 à 50 °C à celle de la colonne.

4.1.2 Four

Le four doit être capable de porter la colonne à une température d'au moins 220 °C et de maintenir la température choisie à 1 °C près.

Dans le cas d'utilisation de conditions programmées, il est conseillé de choisir un appareil à double colonne.

4.1.3 Colonne à remplissage

4.1.3.1 COLONNE

La colonne doit être en matériau inerte vis-à-vis des corps

à analyser : verre, ou, à défaut, acier inoxydable.

NOTE — Si des constituants polyinsaturés à plus de 3 doubles liaisons sont présents, une colonne en acier inoxydable peut provoquer leur décomposition.

— Longueur : de 1 à 3 m. Une colonne relativement courte sera utilisée dans le cas où des acides gras à longue chaîne ($> C_{20}$) sont présents. Dans le cas de la détermination des acides en C_4 et en C_6 , il est recommandé d'utiliser une colonne de 2 m.

— Diamètre intérieur : de 2 à 4 mm.

4.1.3.2 REMPLISSAGE

— Support : terre de diatomées lavée aux acides et silanisée, ou tout autre support inerte pouvant convenir, avec un étroit intervalle de granulométrie (25 μ m entre 125 et 200 μ m), la dimension moyenne étant liée au diamètre intérieur et à la longueur de la colonne.

— Phase stationnaire : phase polaire de type polyester (par exemple polysuccinate de diéthylèneglycol, polysuccinate de butanediol, polyadipate d'éthylèneglycol, etc.), cyanosilicones ou toute autre phase permettant la séparation chromatographique (voir chapitre 5). Le taux d'imprégnation sera compris entre 5 et 20 %. Pour certaines séparations, des phases apolaires pourront être utilisées.

4.1.3.3 CONDITIONNEMENT DE LA COLONNE

Après avoir, si possible, déconnecté la colonne du détecteur, porter progressivement le four à 185 °C et maintenir la colonne venant d'être préparée, sous un courant de gaz inerte de 20 à 60 ml/min durant au moins 16 h à cette température, puis durant 2 h à 195 °C.

4.1.4 Détecteur

Le détecteur sera de préférence capable d'être porté à une température supérieure à celle de la colonne.

4.2 Seringue

Seringue de 10 μ l au maximum, graduée en 0,1 μ l.

4.3 Enregistreur

Lorsque la courbe enregistrée est utilisée pour calculer la composition du mélange analysé, l'enregistreur doit être un appareil électronique de grande précision, compatible avec l'appareillage utilisé, et ayant les caractéristiques suivantes :

- vitesse de réponse inférieure à 1,5 s, de préférence 1 s; (La vitesse de réponse est le temps nécessaire pour que la plume de l'enregistreur aille de 0 à 90 % lors de l'introduction soudaine d'un signal de 100 %.)
- largeur du papier : 25 cm minimum;
- vitesse de déroulement du papier : réglable à des valeurs comprises entre 0,4 et 2,5 cm/min.

4.4 Intégrateur ou calculateur (facultatif)

L'emploi d'un intégrateur électronique ou d'un calculateur permet un calcul rapide et précis. Celui-ci doit fournir une réponse linéaire, avoir une sensibilité suffisante, et la correction de la déviation de la ligne de base doit être satisfaisante.

5 MODE OPÉRATOIRE

Les détails opératoires donnés ci-dessous concernent l'emploi d'un détecteur à ionisation de flamme.

NOTE — Un appareil de chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) peut être utilisé. Les conditions opératoires doivent alors être modifiées comme indiqué au chapitre 7.

5.1 Conditions d'essai

5.1.1 Choix des conditions optimales de travail

Pour choisir les conditions de travail, il y a lieu de tenir compte des variables suivantes :

- longueur et diamètre de la colonne;
- nature et quantité de la phase stationnaire;
- température de la colonne;
- débit du gaz vecteur;
- résolution souhaitée;
- importance de la prise d'essai, choisie de façon telle que l'ensemble détecteur-électromètre fournisse une réponse linéaire;
- durée de l'analyse.

En général, les valeurs suivantes seront celles donnant les résultats désirés, à savoir nombre de plateaux théoriques, pour le stéarate de méthyle, au moins égal à 2 000 et élution de celui-ci en 15 min environ :

Diamètre intérieur de la colonne	Vitesse du gaz vecteur
mm	ml/min
2	15 à 25
3	20 à 40
4	40 à 60

Concentration de la phase stationnaire	Température
%	°C
5	175
10	180
15	185
20	185

Lorsque l'appareil le permet, l'injecteur devrait être à une température voisine de 200 °C, et le détecteur à une température égale ou supérieure à celle de la colonne.

En général, le rapport du débit d'hydrogène du détecteur à ionisation de flamme à celui du gaz vecteur, varie de 1 : 2 à 1 : 1, selon le diamètre de la colonne. Le débit d'oxygène est d'environ 5 à 10 fois celui de l'hydrogène.

5.1.2 Détermination de l'efficacité et de la résolution

Effectuer l'analyse d'un mélange de stéarate et d'oléate de méthyle en proportions sensiblement équivalentes (par exemple esters méthyliques de beurre de cacao).

Choisir l'importance de la prise d'essai, la température de la colonne et le débit du gaz vecteur, de façon que le maximum du pic du stéarate de méthyle soit enregistré environ 15 min après le pic du solvant, et que ce pic corresponde à environ les 3/4 de l'échelle totale.

Calculer le nombre de plateaux théoriques, n , à l'aide de la formule

$$n = 16 \left(\frac{dR_1}{\omega_1} \right)^2$$

et la résolution R , par la formule

$$R = \frac{2\Delta}{\omega_1 + \omega_2}$$

où

dR_1 est la distance de rétention, en millimètres, mesurée à partir de l'introduction jusqu'au maximum relatif du pic du stéarate de méthyle;

ω_1 et ω_2 sont les largeurs, en millimètres, des pics du stéarate et de l'oléate de méthyle, mesurées entre les points d'intersection avec la ligne de base des tangentes aux points d'inflexion de la courbe;

Δ est la distance entre les maxima relatifs des pics du stéarate et de l'oléate de méthyle.

(Voir le diagramme ci-dessous.)

Les conditions opératoires sont celles donnant un nombre de plateaux théoriques pour le stéarate de méthyle, au moins égal à 2 000, et une résolution d'au moins 1,25.

5.2 Prise d'essai

À l'aide de la seringue (4.2), prélever de 0,1 à 2 μl de la solution d'esters méthyliques obtenue selon l'ISO 5509. Dans le cas des esters exempts de solvants, préparer une solution à 100 mg/ml environ dans de l'heptane pour chromatographie en phase gazeuse et injecter 0,1 à 1 μl de cette solution.

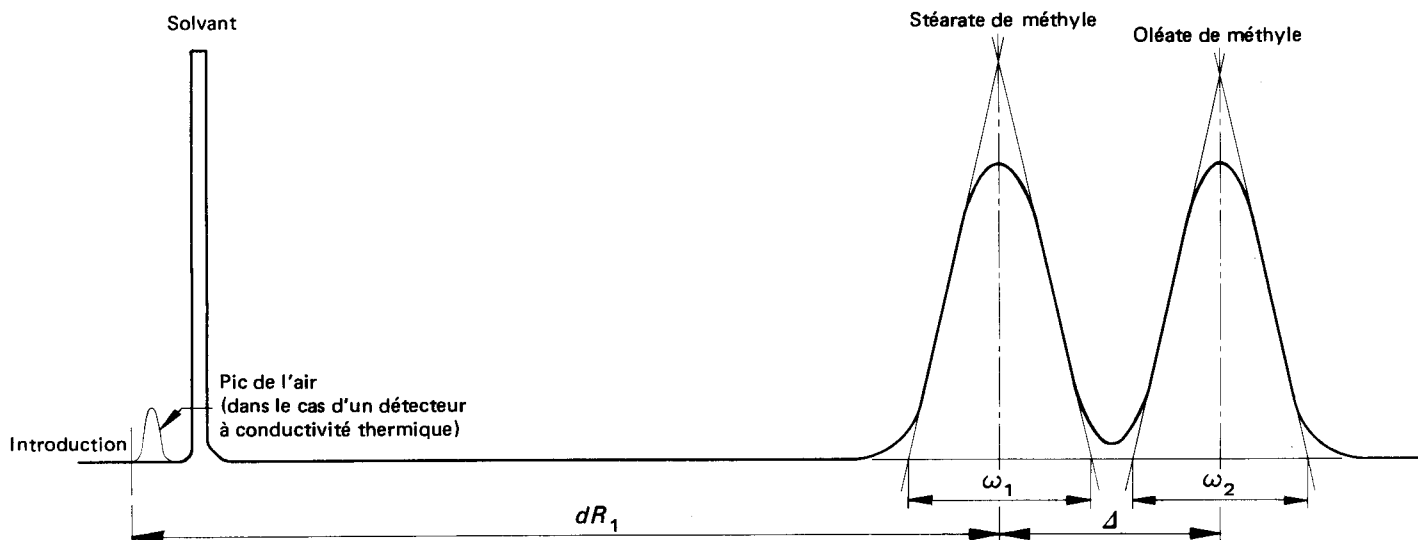
Pour la recherche de constituants présents à l'état de traces, cette prise d'essai pourra être augmentée (jusqu'à dix fois).

5.3 Analyse

Dans les cas usuels, opérer dans les conditions décrites en 5.1.1. Toutefois, il est possible d'opérer avec une température de colonne plus basse, dans le cas où il est nécessaire de doser des acides gras dont le nombre d'atomes de carbone est inférieur à 12, ou plus élevée dans le cas où il est nécessaire de doser des acides gras dont le nombre d'atomes de carbone est supérieur à 20.

Éventuellement, il est possible d'opérer en température programmée dans les deux cas précédents. Par exemple, si l'échantillon contient des esters méthyliques d'acides gras à moins de 12 atomes de carbone, injecter l'échantillon à 100 °C (ou à 50 à 60 °C si l'acide butyrique est présent) et programmer immédiatement à 4 à 8 °C/min jusqu'à la température optimale. Dans certains cas, les deux procédés peuvent être combinés. Après la période de programmation de température, continuer l'élution en température isotherme jusqu'à élution de tous les constituants. Si l'appareil ne peut pas travailler en température programmée, opérer à deux températures fixées entre 100 et 195 °C.

Si nécessaire, il est recommandé de faire une analyse sur deux phases fixes de polarités différentes pour vérifier l'absence de pics masqués, par exemple pour les huiles de poissons, ou dans le cas de la présence simultanée de $C_{18:3}$ et $C_{20:0}$, ou de $C_{18:3}$ et $C_{18:2}$ conjugué.



6 EXPRESSION DES RÉSULTATS

6.1 Analyse qualitative

Analyser le mélange témoin (voir 3.3), dans les conditions opératoires identiques à celles de l'essai, et déterminer les temps de rétention ou les distances de rétention pour les acides gras constitutifs. Tracer sur papier semi-logarithmique pour chaque taux d'insaturation, les courbes donnant le logarithme du temps de rétention ou de la distance de rétention en fonction du nombre d'atomes de carbone; dans des conditions isothermes et pour des esters à chaîne droite et un taux d'insaturation fixé, ces courbes doivent être des droites. Ces droites doivent être pratiquement parallèles.

Pour l'essai, identifier les pics en se reportant à ces droites, au besoin en interpolant.

Éviter les conditions opératoires favorisant l'existence de «pics masqués», c'est-à-dire que deux constituants ne puissent être distingués par suite d'une résolution insuffisante.

6.2 Analyse quantitative

6.2.1 Détermination de la composition

Utiliser la méthode de normalisation interne (sauf exceptions), c'est-à-dire admettre que la totalité des constituants présents dans l'échantillon est représentée sur le chromatogramme, donc que la somme des aires des pics représente 100 % des constituants (élution totale).

Si l'appareillage comporte un intégrateur, utiliser les chiffres fournis par celui-ci. Dans le cas contraire, déterminer l'aire de chaque pic en multipliant la hauteur du pic par sa largeur à mi-hauteur, en tenant compte des diverses atténuations éventuellement utilisées au cours de l'enregistrement.

6.2.2 Mode de calcul et formules

6.2.2.1 CAS GÉNÉRAL

Calculer la teneur en un constituant donné, exprimée en pourcentage en masse d'esters méthyliques, en déterminant le pourcentage représenté par le rapport de l'aire du pic correspondant à la somme des aires de la totalité des pics, comme suit :

Pourcentage en masse du composé i , exprimé en esters méthyliques,

$$= \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100$$

où

A_i est l'aire du pic correspondant au composé i ;

$\sum A_i$ est la somme des aires de la totalité des pics.

Donner le résultat avec une décimale.

NOTE – Dans ce cas général, le résultat du calcul basé sur les aires relatives est considéré représenter un pourcentage en masse. Dans le cas où cette hypothèse n'est pas permise, voir 6.2.2.2.

6.2.2.2 CAS DE L'EMPLOI DES FACTEURS DE CORRECTION

Dans certains cas, notamment en présence d'acides dont le nombre d'atomes de carbone est inférieur à 8 ou d'acides à fonctions secondaires, lors de l'emploi de détecteurs à conductibilité thermique, ou si le plus grand degré de précision est spécialement demandé, il y a lieu de faire intervenir des facteurs de correction pour convertir les pourcentages des aires des pics en pourcentages en masse des constituants.

Déterminer les facteurs de correction à l'aide d'un chromatogramme obtenu à partir d'un mélange témoin d'esters méthyliques de composition exactement connue dans des conditions identiques à celles de l'essai.

Pour ce mélange témoin :

Pourcentage en masse du composé i

$$= \frac{m_i}{\sum m_i} \times 100$$

où

m_i est la masse du composé i dans le mélange témoin;

$\sum m_i$ est la somme des masses des divers constituants du mélange témoin.

Le chromatogramme obtenu à partir du mélange témoin permet de calculer :

Pourcentage (aire/aire) du composé i

$$= \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100$$

où

A_i est l'aire du pic correspondant au composé i ;

$\sum A_i$ est la somme des aires de la totalité des pics.

D'où, le facteur de correction

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A_i}{A_i \times \sum m_i}$$

Habituellement, les facteurs de correction sont ramenés à K_{C16} , et les facteurs relatifs deviennent :

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

Pour l'échantillon, la teneur en chaque constituant est donnée par :

Pourcentage en masse du composé i , exprimé en esters méthyliques,

$$= \frac{K'_i \times A_i}{\sum (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Donner le résultat avec une décimale.

6.2.2.3 CAS DE L'EMPLOI D'UN ÉTALON INTERNE

Dans certains cas (notamment pour le dosage des acides en C₄ et C₆ et le dosage des acides dans le cas où tous les acides gras ne sont pas élués), il y a lieu d'utiliser un étalon interne (respectivement C₅ et C₁₅ ou C₁₇) et, par suite, de déterminer le facteur de correction de l'étalon interne.

Pourcentage en masse du composé *i*, exprimé en esters méthyliques,

$$= \frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

où

m_s est la masse, en milligrammes, de l'étalon interne;

m est la masse, en milligrammes, de l'échantillon;

K'_s est le facteur de correction de l'étalon interne (relatif à K_{C16});

K'_i est le facteur de correction du composé *i* (relatif à K_{C16});

A_s est la surface du pic correspondant à l'étalon interne;

A_i est la surface du pic correspondant au constituant *i*.

Donner le résultat avec une décimale.

6.2.3 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées le même jour, par le même analyste, avec le même appareil et le même matériau d'essai pour les constituants présents à plus de 5 %, ne doit pas excéder en valeur relative 3 % de la valeur déterminée, avec un maximum de 1 % absolu. Pour des constituants présents en quantités inférieures la différence ne doit pas dépasser une valeur de 0,2 % absolue.

6.2.4 Reproductibilité

La différence entre les résultats obtenus, dans deux laboratoires différents sur le même matériau d'essai pour les constituants présents à plus de 5 %, ne doit pas excéder en valeur relative 10 % de la valeur déterminée, avec un maximum de 3 % absolu. Pour des constituants présents en quantités inférieures, la différence ne doit pas dépasser une valeur de 0,5 % absolue.

NOTE — L'expression «matériau d'essai» correspond à l'échantillon de corps gras ou d'acide gras. La répétabilité et la reproductibilité couvrent la préparation des esters méthyliques selon l'ISO 5509, avec l'analyse par chromatographie en phase gazeuse décrite ci-avant.

7 CAS PARTICULIER DE L'UTILISATION D'UN DÉTECTEUR À CONDUCTIBILITÉ THERMIQUE (CATHAROMÈTRE)

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) peut être utilisé. Dans ce cas, les conditions spécifiées aux chapitres 4 et 5 doivent être modifiées comme suit :

Colonne : Longueur 2 à 4 m;
diamètre intérieur : 4 mm

Support : granulométrie entre 160 et 200 μm.

Taux d'imprégnation de la phase stationnaire : 15 à 25 %.

Gaz vecteur : hélium, ou à défaut hydrogène, à teneur aussi faible que possible en oxygène.

Pas de gaz auxiliaires.

Température de l'injecteur : de 40 à 60 °C supérieure à celle de la colonne.

Température de la colonne : 180 à 200 °C.

Débit du gaz vecteur : généralement compris entre 60 et 80 ml/min.

Quantités injectées : généralement entre 0,5 et 2 μl.

Pour l'analyse quantitative, utiliser les facteurs de correction définis en 6.2.2.2.

8 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer les méthodes utilisées pour la préparation des esters méthyliques et pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, ainsi que les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.