

NORME INTERNATIONALE

ISO
5508

Deuxième édition
1990-09-15

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

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Animal and vegetable fats and oils — Analysis by gas chromatography
of methyl esters of fatty acids*

ISO 5508:1990

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e1595e0e-7431-471d-a359-
b1273c24cf3f/iso-5508-1990](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e1595e0e-7431-471d-a359-b1273c24cf3f/iso-5508-1990)

INTERNATIONAL

ISO



Numéro de référence
ISO 5508:1990(F)

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 projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 5508 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 5508:1978), dont elle constitue une révision technique.

© ISO 1990

Droits de reproduction réservés. 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation Internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

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

1 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, en utilisant des colonnes remplies ou capillaires.

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

2 Référence normative

La norme suivante contient des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 5509:1978, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation des esters méthyliques d'acides gras*.

3 Réactifs

3.1 Gaz vecteur

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

NOTE 1 L'hydrogène que l'on utilise comme gaz vecteur uniquement avec les colonnes capillaires permet de

doubler la vitesse d'analyse mais présente des dangers. Il existe cependant des dispositifs de sécurité.

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 d'acides gras purs, ou esters méthyliques d'un corps gras, de composition connue, si possible voisine de celle du corps gras à analyser.

Prendre toutes précautions afin d'éviter l'oxydation des acides gras polyinsaturés.

4 Appareillage

Les prescriptions fournies concernent les appareils usuels de chromatographie en phase gazeuse utilisant des colonnes remplies et/ou capillaires et un détecteur à ionisation de flamme. Tout appareillage ayant la même efficacité et la même résolution que celles définies en 5.1.2 convient.

4.1 Appareil de chromatographie en phase gazeuse.

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse doit comprendre les éléments suivants.

4.1.1 Dispositif d'injection.

Utiliser un dispositif d'injection

a) soit avec des colonnes remplies, le dispositif ayant le plus faible volume mort possible (dans ce cas, il doit pouvoir être porté à une tempéra-

ture supérieure, de 20 °C à 50 °C, à celle de la colonne);

- b) soit avec des colonnes capillaires, auquel cas le dispositif doit être spécialement conçu pour l'utilisation de telles colonnes. Il peut être du type diviseur ou du type à injection totale en tête de colonne refroidie (injecteur «on column»).

NOTE 2 En l'absence de corps gras contenant des acides gras à moins de 16 atomes de carbone, un injecteur à aiguille mobile peut être utilisé.

4.1.2 Four.

Le four doit être en mesure de porter la colonne à une température d'au moins 260 °C et de maintenir la température choisie à 1 °C près avec une colonne remplie et à 0,1 °C près avec une colonne capillaire. Cette dernière caractéristique est particulièrement importante lorsqu'on utilise un tube en silice fondue.

L'utilisation d'un appareil équipé d'un programmeur de température est recommandée dans tous les cas et, en particulier, en présence d'acides gras à moins de 16 atomes de carbone.

4.1.3 Colonne remplie.

4.1.3.1 **Colonne**, en matériau inerte vis-à-vis des corps à analyser: verre, ou, à défaut, acier inoxydable, ayant les dimensions suivantes:

- a) Longueur: de 1 m à 3 m. Une colonne relativement courte sera utilisée dans le cas où des acides gras à longue chaîne (> C₂₀) sont présents. Dans le cas de la détermination des acides en C₄ et en C₆, il est recommandé d'utiliser une colonne de 2 m.
- b) Diamètre intérieur: de 2 mm à 4 mm.

NOTES

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

4 Un système à double colonne remplie peut être utilisé.

4.1.3.2 **Remplissage**, comprenant les éléments suivants:

- a) Support: terre de diatomées lavée aux acides et silanisée, ou tout autre support inerte pouvant convenir, avec un étroit intervalle de granulométrie (25 µm entre 125 µm et 200 µm), la dimension moyenne étant liée au diamètre intérieur et à la longueur de la colonne.
- b) 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 article 5). Le taux d'imprégnation sera compris entre 5 % (m/m) et 20 % (m/m). 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 ml/min à 60 ml/min durant au moins 16 h à cette température, puis durant 2 h à 195 °C.

4.1.4 Colonne capillaire.

4.1.4.1 **Tube**, en matériau inerte vis-à-vis des corps à analyser, généralement en verre ou en silice fondue. Le diamètre interne doit être compris entre 0,2 mm et 0,8 mm. Intérieurement, il devra subir des traitements appropriés (préparation de l'état de surface, inactivation) avant de recevoir le film de phase stationnaire. Une longueur de 25 m est suffisante dans la plupart des cas.

4.1.4.2 **Phase stationnaire**, principalement de type polyglycols [poly(éthylène glycol) 20 000], polyesters (polysuccinate de butanediol) ou polysiloxanes polaires (cyanosilicones). Les colonnes greffées, ou réticulées, conviennent.

NOTE 5 Toutefois les polysiloxanes polaires risquent de donner des difficultés dans l'identification et la séparation de l'acide linoléique et des acides en C₂₀.

Les épaisseurs de film doivent être faibles: 0,1 µm à 0,2 µm.

4.1.4.3 Montage et conditionnement de la colonne.

Respecter les précautions habituelles de montage des colonnes capillaires, c'est-à-dire la disposition de la colonne dans le four (support), le choix et le montage des joints (étanchéité), le positionnement des extrémités de la colonne dans l'injecteur et le détecteur (réduction des volumes morts). Mettre la colonne sous gaz vecteur [par exemple, 0,3 bar (30 kPa) pour une colonne de 25 m de longueur et d'un diamètre intérieur de 0,3 mm].

Conditionner la colonne par programmation de la température du four à 3 °C/min depuis la température ambiante jusqu'à une température inférieure à 10 °C à la limite de décomposition de la phase stationnaire. Maintenir à cette température 1 h, jusqu'à stabilisation de la ligne de base. Revenir à 180 °C pour travailler dans des conditions isothermes.

NOTE 6 Des colonnes préconditionnées adéquates sont disponibles commercialement.

4.1.5 Détecteur, de préférence capable d'être porté à une température supérieure à celle de la colonne.

4.2 Seringue.

La seringue doit avoir une capacité de 10 µl au maximum et être graduée en 0,1 µl.

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, 20 cm minimum;
- vitesse de déroulement du papier, réglable à des valeurs comprises entre 0,4 cm/min 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 en 5.1 à 5.3 concernent l'emploi d'un détecteur à ionisation de flamme.

En variante, 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 décrit à l'article 7.

5.1 Conditions d'essai

5.1.1 Choix des conditions optimales de travail

5.1.1.1 Sur colonne remplie

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

- la longueur et le diamètre de la colonne;
- la nature et la quantité de la phase stationnaire;
- la température de la colonne;

d) le débit du gaz vecteur;

e) la résolution souhaitée;

f) l'importance de la prise d'essai, choisie de façon telle que l'ensemble détecteur-électromètre fournisse une réponse linéaire;

g) la durée de l'analyse.

En général, les valeurs données dans le tableau 1 et le tableau 2 seront celles donnant les résultats désirés, à savoir un nombre de plateaux théoriques, au moins égal à 2 000 par mètre de colonne pour le stéarate de méthyle, et élution de celui-ci en 15 min environ.

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.

Tableau 1

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

Tableau 2

Concentration de la phase stationnaire % (m/m)	Température de la colonne °C
5	175
10	180
15	185
20	185

5.1.1.2 Sur colonne capillaire

Les caractéristiques d'efficacité et de perméabilité des colonnes capillaires font que la séparation entre constituants et la durée de l'analyse sont très dépendantes du débit de gaz vecteur dans la colonne. Il y aura nécessité, en jouant sur ce paramètre (ou plus simplement sur la perte de charge en tête de colonne), d'optimiser les conditions opératoires se-

lon que l'on recherche, soit à améliorer les séparations, soit à faire de l'analyse rapide.

5.1.2 Détermination du nombre de plateaux théoriques (efficacité) et de la résolution

(Voir figure 1.)

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 trois quarts de l'échelle totale.

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

$$n = 16 \left(\frac{d_{r(I)}}{\omega_{(I)}} \right)^2$$

et la résolution R , par la formule

$$R = \frac{2\Delta}{\omega_{(I)} + \omega_{(II)}}$$

où

$d_{r(I)}$ est la distance de rétention, en millimètres, mesurée à partir du début du chromatogramme jusqu'au maximum du pic du stéarate de méthyle;

$\omega_{(I)}$ et $\omega_{(II)}$ 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, en millimètres, entre les maxima relatifs des pics du stéarate et de l'oléate de méthyle.

Les conditions opératoires sont celles donnant un nombre de plateaux théoriques pour le stéarate de méthyle, au moins égal à 2000 par mètre de colonne, et une résolution d'au moins 1,25.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

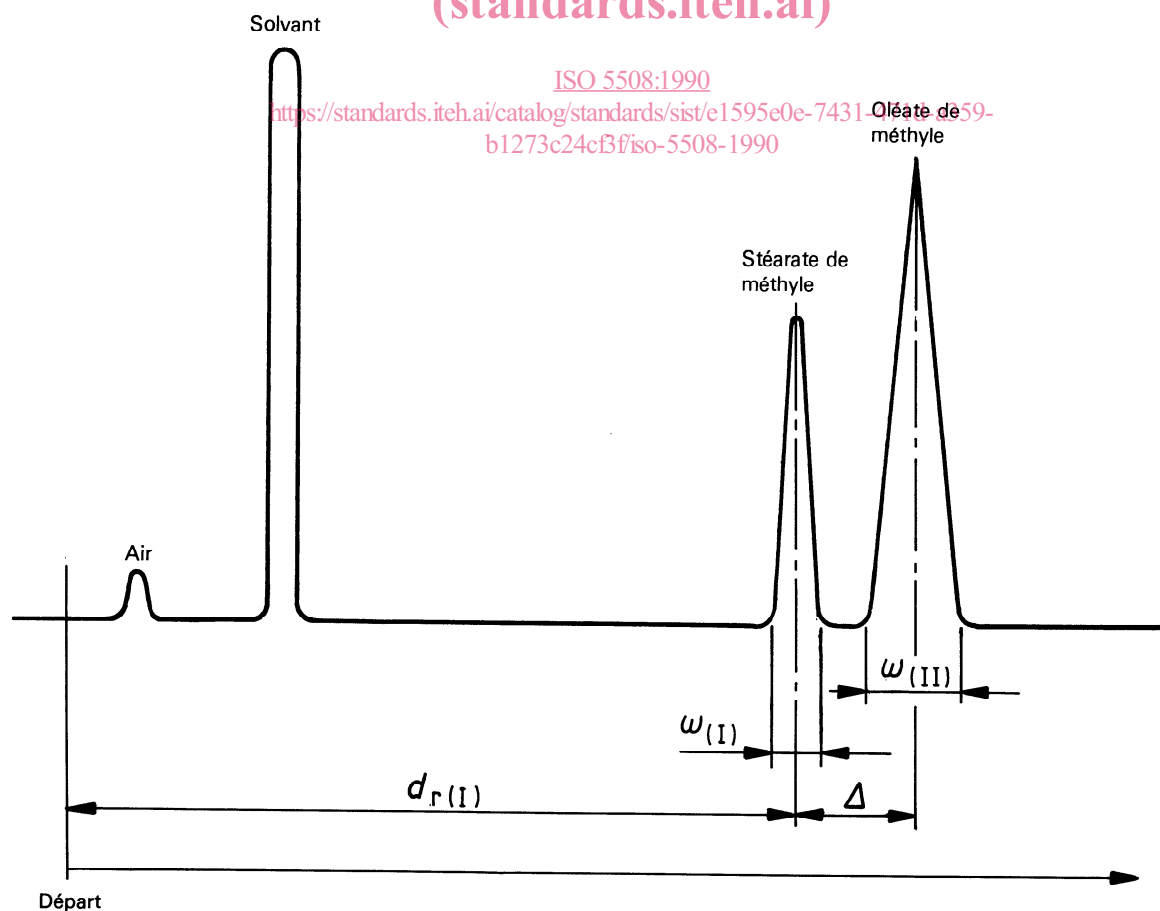


Figure 1 — Chromatogrammes pour la détermination du nombre de plateaux théoriques (efficacité) et de la résolution

5.2 Prise d'essai

À l'aide de la seringue (4.2), prélever de 0,1 µl à 2 µl de la solution d'esters méthyliques obtenue selon l'ISO 5509 et les injecter dans la colonne.

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 µl 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. 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 °C à 60 °C si l'acide butyrique est présent) et programmer immédiatement à un débit de 4 °C/min 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 °C 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.

5.4 Préparation du chromatogramme de référence et des courbes de référence

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.

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 Expression des résultats

6.1 Analyse qualitative

Pour l'essai, identifier les pics du méthyl ester en se reportant aux courbes préparées en 5.4, au besoin en interpolant.

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

6.2.2.1 Cas général

Calculer la teneur en un constituant donné, exprimée en pourcentage en masse, des 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, à l'aide de la formule

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

où

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

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

Donner le résultat avec une décimale.

NOTE 7 Dans ce cas général, le résultat du calcul basé sur les aires relatives est considéré représenter un pour-

centage 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, par exemple en présence d'acides gras dont le nombre d'atomes de carbones est inférieur à 8 ou d'acides à fonctions secondaires, lors de l'emploi de détecteurs à conductivité 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, le pourcentage en masse du composé i est donné par la formule

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

où

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

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

À partir du chromatogramme du mélange témoin (5.4), calculer le pourcentage (aire/aire) du composé i comme suit:

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

où

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

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

D'où, le facteur de correction

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

Habituellement, les facteurs de correction sont exprimés par rapport à $K_{C_{16}}$, et les facteurs relatifs deviennent:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C_{16}}}$$

Pour l'échantillon, la teneur en chaque composé i , exprimée en pourcentage en masse des esters méthyliques, est

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

Donner le résultat avec une décimale.

6.2.2.3 Cas de l'emploi d'un étalon interne

Dans certaines analyses (par exemple, lorsque tous les acides gras ne sont pas quantifiés, et que des acides en C_4 et en C_6 sont présents à côté d'acides en C_{16} et en C_{18} , ou bien lorsqu'il est nécessaire de déterminer la quantité absolue d'acides gras dans un échantillon), il est nécessaire d'utiliser un étalon interne. Des acides gras en C_5 , C_{15} ou C_{17} sont utilisés fréquemment. Le facteur de correction de l'étalon interne doit être déterminé (s'il y a lieu).

Le pourcentage en masse du composé i , exprimé en esters méthyliques, est par suite donné par la formule

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

où

A_i est la surface du pic correspondant au constituant i ;

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

K'_i est le facteur de correction du composé i (relatif à $K_{C_{16}}$);

K'_s est le facteur de correction de l'étalon interne (relatif à $K_{C_{16}}$);

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

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

Donner le résultat avec une décimale.

6.2.3 Fidélité

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité indiquées ci-après couvrent la préparation des esters méthyliques selon l'ISO 5509, avec l'analyse par chromatographie en phase gazeuse décrite dans la présente Norme internationale. Ces valeurs ont été acceptés historiquement.

6.2.3.1 Répétabilité

La différence entre les valeurs de deux déterminations effectuées rapidement l'une après l'autre par le même analyste utilisant le même appareillage sur le même échantillon pour essai et pour les constituants présents à plus de 5 % (*m/m*), ne doit pas excéder en valeur relative 3 % de la valeur déterminée, avec un maximum de 1 % (*m/m*). Pour des constituants présents en quantités inférieures, la différence ne doit pas dépasser une valeur de 0,2 % (*m/m*).

6.2.3.2 Reproductibilité

La différence entre les valeurs de résultat final obtenues par deux laboratoires différents utilisant la présente méthode pour l'analyse du même échantillon pour laboratoire, pour les constituants présents à plus de 5 % (*m/m*), ne doit pas excéder en valeur relative 10 % de la valeur déterminée, avec un maximum de 3 % (*m/m*). Pour des constituants présents en quantités inférieures, la différence ne doit pas dépasser une valeur de 0,5 % (*m/m*).

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 également pour la détermination de la composition qualitative et quantitative d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras. Dans ce cas, les conditions spécifiées à l'article 4 et à l'article 5 doivent être modifiées comme indiqué dans le tableau 3.

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

8 Rapport d'essai

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

Tableau 3

Variable	Valeur/condition
Colonne	Longueur: 2 m à 4 m diamètre intérieur: 4 mm
Support	Granulométrie entre 160 µm et 200 µm
Taux d'imprégnation de la phase stationnaire	15 % (<i>m/m</i>) à 25 % (<i>m/m</i>)
Gaz vecteur	Hélium, ou à défaut hydrogène, à teneur aussi faible que possible en oxygène
Gaz auxiliaires	Néant
Température de l'injecteur	De 40 °C à 60 °C supérieure à celle de la colonne
Température de la colonne	180 °C à 200 °C
Débit du gaz vecteur	Généralement compris entre 60 ml/min et 80 ml/min
Quantités injectées	Généralement comprises entre 0,5 µl et 2 µl