
NORME INTERNATIONALE 5509

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

Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation des esters méthyliques d'acides gras

Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids

Première édition — 1978-10-15

ITh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 5509:1978](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efaa312-5929-4d6d-8891-0c059476fd34/iso-5509-1978)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efaa312-5929-4d6d-8891-0c059476fd34/iso-5509-1978>

CDU 664.3 : 661.73

Réf. n° : ISO 5509-1978 (F)

Descripteurs : corps gras, corps gras animal, corps gras végétal, huile végétale, acide gras, ester méthylique, spécimen d'essai.

Prix basé sur 6 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 5509 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en juillet 1976.

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

[ISO 5509:1978](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efaa312-5929-4d6d-8891-0c059478131/iso-5509-1978)

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

Aucun comité membre ne l'a désapprouvée.

Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation des esters méthyliques d'acides gras

1 OBJET

La présente Norme internationale spécifie des méthodes de préparation des esters méthyliques d'acides gras.

Les esters méthyliques ainsi obtenus peuvent être utilisés dans diverses méthodes d'analyse exigeant une telle transformation, par exemple chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en couche mince, spectrophotométrie infra-rouge, etc.

2 DOMAINE D'APPLICATION

2.1 Les méthodes spécifiées dans les chapitres 4 et 5 sont applicables à la préparation des esters méthyliques des acides gras ayant 6 atomes de carbone ou plus, à partir de tous les types de corps gras et d'acides gras d'origines animale et végétale. En présence d'acides gras à 6 ou 8 atomes de carbone et, dans le cas de la préparation des esters méthyliques en vue de la chromatographie en phase gazeuse, il est essentiel que le solvant ne soit pas éliminé de la solution des esters méthyliques.

La méthode générale utilisant le trifluorure de bore (chapitre 4) doit être utilisée de préférence pour la plupart des corps gras, mais peut fournir des résultats erronés dans les cas suivants :

- composés à fonctions oxygénées secondaires (hydroxy, hydroperoxy, céto, époxy);
- composés à fonction cyclopropanique et composés à fonction cyclopropénique;
- composés polyinsaturés conjugués et composés acétyléniques;
- cires.

Pour ces produits, il est préférable d'utiliser l'une des méthodes décrites au chapitre 5. Toutefois, les corps gras contenant de telles fonctions en très faibles proportions (huile de coton par exemple) peuvent être estérifiés selon la méthode générale du chapitre 4.

Voir aussi 8.1.

2.2 La méthode particulière décrite au chapitre 6 est applicable à la préparation des esters méthyliques des acides gras à 4 atomes de carbone, ou plus, à partir des corps gras neutres (indice d'acide inférieur à 2), principalement en vue de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

3 RÉFÉRENCE

ISO/R 661, *Matières grasses végétales brutes — Préparation de l'échantillon pour laboratoire en vue de l'analyse.*

4 MÉTHODE GÉNÉRALE UTILISANT LE TRIFLUORURE DE BORE

AVERTISSEMENT — Le trifluorure de bore est un composé toxique. C'est pourquoi il n'est pas conseillé à l'analyste de préparer lui-même cette solution à partir du trifluorure de bore et de méthanol (voir 8.3).

Les méthodes décrites nécessitent l'utilisation de réactifs pouvant présenter un danger. Les précautions habituelles doivent être prises pour la protection des yeux et contre les risques de brûlures chimiques.

4.1 Principe

Saponification des glycérides, puis estérification des acides gras libérés en présence de trifluorure de bore.

4.2 Réactifs

Sauf indication contraire, les réactifs doivent être de qualité analytique et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

4.2.1 Hydroxyde de sodium, solution méthanolique environ 0,5 N.

Dissoudre 2 g d'hydroxyde de sodium dans 100 ml de méthanol ne contenant pas plus de 0,5 % (m/m) d'eau. Lorsque la solution doit être utilisée durant une période de temps assez longue, un peu de carbonate de sodium se forme (précipité blanc); celui-ci n'a aucune influence sur la préparation des esters méthyliques.

4.2.2 Trifluorure de bore, solution méthanolique de 12 à 15 % (m/m)¹⁾ (voir 8.2).

1) Des solutions à 14 et 50 % existent dans le commerce.

4.2.3 Heptane, pour chromatographie (voir 8.2 et 8.4).

4.2.4 Éther de pétrole, redistillé (intervalle d'ébullition 40 à 60 °C), indice de brome inférieur à 1, exempt de résidu, ou hexane (voir 8.2).

4.2.5 Sulfate de sodium, anhydre.

4.2.6 Chlorure de sodium, solution aqueuse saturée.

4.2.7 Rouge de méthyle, solution éthanolique à 1 g/l dans l'éthanol à 60 % (V/V).

4.2.8 Azote, contenant moins de 5 mg/kg d'oxygène.

4.3 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.3.1 Ballons à fond rond, de 50 ou de 100 ml, à col rodé.

4.3.2 Réfrigérant droit, à reflux, de 20 à 30 cm de longueur, avec rodage adaptable sur le ballon (4.3.1).

4.3.3 Régularisateur d'ébullition, exempt de matières grasses.

4.3.4 Pipette graduée, d'une capacité au moins égale à 10 ml et munie d'une poire pour pipette; ou pipette automatique.

4.3.5 Tubulure, pour barbotage d'azote.

4.3.6 Tube à essais, muni d'un rodage et d'un bouchon rodé en verre, adapté.

4.3.7 Ampoules à décanter de 250 ml.

4.4 Mode opératoire

Par suite des propriétés toxiques du trifluorure de bore, les opérations suivantes seront de préférence effectuées sous une hotte ventilée. Toute la verrerie doit être lavée à l'eau immédiatement après emploi.

4.4.1 Préparation de l'échantillon pour essai

L'échantillon pour essai doit être sec et limpide. En conséquence, opérer selon l'ISO/R 661, mais en chauffant l'échantillon juste au-dessus de son point de fusion.

4.4.2 Prise d'essai

Une pesée précise n'est pas normalement nécessaire (voir 8.8). L'importance de la prise d'essai a seulement besoin d'être connue pour choisir la taille du ballon (4.3.1)

et les quantités de réactif et de solvant selon le tableau suivant :

Prise d'essai	Ballon (4.3.1)	Solution NaOH (4.2.1)	Solution de BF ₃ (4.2.2)	Heptane (4.2.3)
mg	ml	ml	ml	ml
100 à 250	50	4	5	1 à 3
250 à 500	50	6	7	2 à 5
500 à 750	100	8	9	4 à 8
750 à 1 000	100	10	12	7 à 10

Dans le cas où les esters méthyliques sont destinés à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, la prise d'essai doit être de préférence d'environ 350 mg (voir 8.5). Si elle est plus faible, il y a lieu de prendre des précautions pour que l'échantillon prélevé soit représentatif.

4.4.3 Saponification (voir 8.1)

4.4.3.1 CAS GÉNÉRAL DES CORPS GRAS

Introduire la prise d'essai dans le ballon approprié (voir 4.4.2). Ajouter la quantité indiquée (voir 4.4.2) de la solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (4.2.1) et un régularisateur d'ébullition (4.3.3). Adapter le réfrigérant (4.3.2) sur le ballon.

NOTE — En présence d'acides gras contenant plus de deux doubles liaisons, il est recommandé d'éliminer l'air contenu dans la solution méthanolique et le ballon par un barbotage d'azote (4.2.8) dans la solution pendant quelques minutes et en maintenant un courant d'azote dans la partie supérieure du réfrigérant pendant la saponification.

Porter à l'ébullition à reflux jusqu'à disparition des gouttelettes de matière grasse (cette opération dure en général 5 à 10 min, mais, dans certains cas exceptionnels, peut demander plus de temps) (voir 8.7). Dans le mélange maintenu à l'ébullition, ajouter la quantité prescrite (voir 4.4.2) de la solution méthanolique de trifluorure de bore (4.2.2) par le haut du réfrigérant en utilisant la pipette graduée munie d'une poire ou la pipette automatique (4.3.4). Procéder ensuite comme indiqué en 4.4.4.

4.4.3.2 CAS PARTICULIER DES ACIDES GRAS

Si l'échantillon est constitué uniquement d'acides gras, la saponification n'est pas nécessaire.

Introduire la quantité voulue d'acides gras dans le ballon approprié (4.4.2). Ajouter la quantité prescrite (voir 4.4.2) de la solution méthanolique de trifluorure de bore (4.2.2) en utilisant la pipette graduée munie d'une poire ou la pipette automatique (4.3.4). Adapter le réfrigérant (4.3.2) sur le ballon et porter à l'ébullition.

4.4.4 Préparation des esters méthyliques

4.4.4.1 Poursuivre l'ébullition durant 2 min.

4.4.4.2 Ajouter au mélange bouillant la quantité prescrite (voir 4.4.2) d'heptane (4.2.3) (voir 8.4) par le haut du réfrigérant (la quantité exacte d'heptane n'a aucune influence sur la réaction) et poursuivre l'ébullition durant 1 min.

Arrêter le chauffage, laisser refroidir à température ambiante, puis débrancher le réfrigérant. Ajouter un peu de solution saturée de chlorure de sodium (4.2.6) et agiter doucement le ballon plusieurs fois par rotation.

Continuer à ajouter de la solution saturée de chlorure de sodium pour amener la hauteur du liquide au niveau du col du ballon.

4.4.4.3 Transférer environ 1 ml de la couche supérieure (solution heptanique) dans un tube à essais (4.3.6) et ajouter un peu du sulfate de sodium anhydre (4.2.5) pour éliminer les traces d'eau.

La solution obtenue contient environ 100 mg/ml d'esters méthyliques et peut être injectée directement dans la colonne de chromatographie en phase gazeuse (voir 7.1).

4.4.4.4 Si l'on veut obtenir la totalité des esters à l'état sec, transférer la solution saline et la phase heptanique dans une ampoule à décanter de 250 ml (4.3.7). Décanter. Recueillir la phase heptanique et extraire la solution saline deux fois avec des fractions de 50 ml d'éther de pétrole ou d'hexane (4.2.4).

Réunir la phase heptanique et les deux extraits, et les laver avec des portions de 20 ml d'eau jusqu'à disparition de l'acidité, contrôlée avec, comme indicateur, le rouge de méthyle (4.2.7). Sécher au moyen de sulfate de sodium anhydre, filtrer et évaporer le solvant sur un bain d'eau bouillante sous courant d'azote (4.2.8). Pour des prises d'essai inférieures à 500 mg, il est préférable de réduire proportionnellement les volumes de solvant et d'eau.

5 MÉTHODES DE REMPLACEMENT N'UTILISANT PAS LE TRIFLUORURE DE BORE

5.1 Méthode applicable aux corps gras neutres (indice d'acide inférieur à 2)

5.1.1 Principe

Méthanolyse des glycérides en milieu alcalin.

5.1.2 Réactifs

Sauf indication contraire, les réactifs doivent être de qualité analytique et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

5.1.2.1 Méthanol, ne contenant pas plus de 0,5 % (m/m) d'eau.

5.1.2.2 Hydroxyde de potassium, solution méthanolique environ 1 N.

Dissoudre 5,6 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml de méthanol (5.1.2.1).

5.1.2.3 Heptane, pour chromatographie (voir 8.2 et 8.4).

5.1.2.4 Sulfate de sodium, anhydre.

5.1.2.5 Azote, contenant moins de 5 mg/kg d'oxygène.

5.1.3 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

5.1.3.1 Agitateur permettant une agitation rapide, et dispositif de chauffage approprié (par exemple agitateur magnétique chauffant).

5.1.3.2 Fiole de 100 ml, à col rodé.

5.1.3.3 Tubulure pour barbotage d'azote.

5.1.3.4 Réfrigérant à reflux, muni d'un joint rodé s'adaptant sur la fiole (5.1.3.2).

5.1.3.5 Régularisateur d'ébullition, exempt de matières grasses.

5.1.3.6 Ampoules à décanter, de 250 ml.

5.1.3.7 Fiole conique de 50 ml, à ouverture étroite.

5.1.4 Mode opératoire

5.1.4.1 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ESSAI

L'échantillon pour essai doit être sec et limpide. En conséquence, opérer selon l'ISO/R 661, mais en chauffant l'échantillon juste au-dessus de son point de fusion.

5.1.4.2 PRISE D'ESSAI

Peser environ 4 g de l'échantillon pour essai (voir 8.5).

5.1.4.3 PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES (voir 8.1)

Introduire la prise d'essai dans la fiole (5.1.3.2). Ajouter environ 40 ml de méthanol (5.1.2.1), 0,5 ml de la solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (5.1.2.2) et le régularisateur d'ébullition (5.1.3.5). Adapter le réfrigérant à reflux (5.1.3.4) à la fiole.

NOTE — En présence d'acides gras contenant plus de deux doubles liaisons, il est recommandé d'éliminer l'air contenu dans la solution méthanolique et le ballon de barbotage d'azote (5.1.2.5) dans la solution durant quelques minutes, et en maintenant un courant d'azote dans la partie supérieure du réfrigérant pendant la saponification.

Porter à l'ébullition. La solution doit devenir limpide. La réaction est normalement terminée au bout de 5 à 10 min (voir 8.7).

Refroidir la fiole sous courant d'eau, et transvaser le contenu de la fiole dans une ampoule à décanter (5.1.3.6).

Rincer la fiole avec 20 ml d'heptane (5.1.2.3) (voir 8.4) et les verser dans l'ampoule. Ajouter environ 40 ml d'eau, agiter et laisser décanter. Les esters se rassemblent dans la phase heptanique supérieure.

Soutirer la phase aqueuse dans une seconde ampoule à décanter et l'extraire à nouveau par 20 ml d'heptane. Réunir les deux extraits et laver deux fois avec 20 ml d'eau. Laisser décanter puis sécher sur sulfate de sodium (5.1.2.4) la solution d'esters, filtrer sur coton et évaporer jusqu'à 20 ml environ le solvant au bain d'eau bouillante, avec barbotage d'azote, dans une fiole conique de 50 ml (5.1.3.7) (voir 8.6).

5.2 Méthode applicable aux corps gras acides (indice d'acide supérieur à 2) et aux acides gras

5.2.1 Principe

Pour les corps gras acides, neutralisation des acides gras libres, méthanolyse alcaline des glycérides, puis estérification des acides gras en milieu acide.

Pour les acides gras, estérification en milieu acide.

5.2.2 Réactifs

Sauf indication contraire, tous les réactifs et les solvants doivent être de qualité analytique, et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

5.2.2.1 Méthylate de sodium, solution méthanolique.

Dissoudre 1 g de sodium dans 100 ml de méthanol ne contenant pas plus de 0,5 % (m/m) d'eau.

5.2.2.2 Acide chlorhydrique, anhydre, solution méthanolique environ 1 N.

NOTES

1 Au laboratoire, il est facile de préparer de petites quantités d'acide chlorhydrique gazeux anhydre par simple déplacement de sa solution commerciale (ρ_{20} 1,18 g/ml) en lui ajoutant peu à peu de l'acide sulfurique concentré (ρ_{20} 1,84 g/ml). Le gaz qui se dégage est simplement séché par barbotage dans de l'acide sulfurique. Le méthanol étant très avide de gaz chlorhydrique, il est bon de prendre toutes les précautions d'usage pour la dissolution, par exemple d'effectuer l'introduction du gaz à l'aide d'un petit entonnoir renversé qui arrive juste à affleurement du niveau du méthanol. Il est d'ailleurs possible de préparer à l'avance des quantités importantes de solutions méthanoliques chlorhydriques qui se conservent parfaitement en flacons rodés maintenus à l'obscurité.

2 Il est possible d'utiliser une solution méthanolique d'acide sulfurique environ 1 N à la place de la solution méthanolique d'acide chlorhydrique, mais la durée de l'estérification doit être d'au moins 20 min, et le sulfate de sodium précipité gêne l'ébullition et impose la filtration ou l'emploi d'un agitateur magnétique.

5.2.2.3 Heptane, pour chromatographie (voir 8.2 et 8.4).

5.2.2.4 Sulfate de sodium, anhydre.

5.2.2.5 Rouge de méthyle, solution à 1 g/l dans l'éthanol à 60 % (V/V).

5.2.2.6 Azote, contenant moins de 5 mg/kg d'oxygène.

5.2.3 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

5.2.3.1 Agitateur, permettant une agitation rapide, et dispositif de chauffage approprié (par exemple agitateur magnétique chauffant).

5.2.3.2 Fiole, de 250 ml, à col rodé.

5.2.3.3 Tubulure pour barbotage d'azote.

5.2.3.4 Réfrigérant à reflux, muni d'un joint rodé s'adaptant sur la fiole (5.2.3.2).

5.2.3.5 Régularisateur d'ébullition, exempt de matières grasses.

5.2.3.6 Ampoules à décanter, de 250 ml.

5.2.3.7 Fiole conique, de 100 ml, à ouverture étroite.

ISO 5509:1978

[https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/efcaa312-5929-4d6d-8891-](https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/efcaa312-5929-4d6d-8891-0c059476fd34/iso-5509-1978)

5.2.4 Mode opératoire

5.2.4.1 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ESSAI

L'échantillon pour essai doit être sec et limpide. En conséquence, opérer selon l'ISO/R 661, mais en chauffant l'échantillon juste au-dessus de son point de fusion.

5.2.4.2 PRISE D'ESSAI

Peser environ 4 g de l'échantillon pour essai (voir 8.5).

5.2.4.3 MÉTHANOLYSE (voir 8.1)

5.2.4.3.1 Cas des corps gras acides

Introduire la prise d'essai dans la fiole (5.2.3.2). Ajouter 40 ml de la solution de méthylate de sodium (5.2.2.1) et un régularisateur d'ébullition (5.2.3.5). Adapter le réfrigérant (5.2.3.4) à la fiole.

NOTES

1 En variante, verser 40 ml de méthanol et ajouter 0,4 g de sodium avant l'introduction de la prise d'essai, ce qui amène à préparer extemporanément une solution de méthylate de sodium.

2 En présence d'acides gras contenant plus de deux doubles liaisons, il est recommandé d'éliminer l'air contenu dans la solution méthanolique et le ballon par un barbotage d'azote (5.2.2.6) dans la solution durant quelques minutes, et en maintenant un courant d'azote dans la partie supérieure du réfrigérant pendant la saponification.

Porter à l'ébullition. La solution doit devenir limpide. La réaction est normalement terminée en moins de 15 min (voir 8.7).

Introduire alors dans la fiole au moins 50 ml de la solution méthanolique d'acide chlorhydrique (5.2.2.2), puis procéder comme en 5.2.4.4.

NOTE — Il se produit, compte tenu de la quantité relativement importante de méthylate de sodium, une précipitation de chlorure de sodium qui peut provoquer quelques soubresauts au cours de l'ébullition qui suit. Il est alors possible de filtrer ce précipité, mais ceci n'est généralement pas nécessaire en raison de la courte durée du chauffage préconisé.

5.2.4.3.2 Cas des acides gras

Si l'échantillon est constitué uniquement d'acides gras, la saponification n'est pas nécessaire.

Introduire la prise d'essai dans la fiole (5.2.3.2). Ajouter 50 ml de solution méthanolique d'acide chlorhydrique (5.2.2.2), et le régularisateur d'ébullition (5.2.3.5). Adapter le réfrigérant (5.2.3.4) à la fiole.

NOTE — En présence d'acides gras contenant plus de deux doubles liaisons, il est recommandé d'éliminer l'air contenu dans la solution méthanolique et le ballon par un barbotage d'azote (5.2.2.6) dans la solution durant quelques minutes, et en maintenant un courant d'azote dans la partie supérieure du réfrigérant pendant la saponification.

5.2.4.4 PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES

Porter la fiole à l'ébullition pendant 10 min, la refroidir sous courant d'eau et ajouter ensuite dans la fiole 100 ml d'eau, puis transvaser le mélange dans l'ampoule à décanter de 250 ml (5.2.3.6) et ajouter 30 ml d'heptane (5.2.2.3) (voir 8.4). Agiter vigoureusement et laisser décanter, jusqu'à séparation complète des deux phases. Recueillir la phase heptanique. Épuiser la phase aqueuse une seconde fois par 30 ml d'heptane. Réunir les deux extraits heptaniques et les laver plusieurs fois avec des fractions de 20 ml d'eau jusqu'à disparition de l'acidité contrôlée avec le rouge de méthyle (5.2.2.5) comme indicateur. Sécher sur sulfate de sodium anhydre (5.2.2.4). Filtrer sur coton et évaporer le solvant sur un bain d'eau bouillante en opérant dans la fiole conique de 100 ml (5.2.3.7) avec barbotage d'azote, jusqu'à ce qu'il reste environ 20 ml (voir 8.6).

6 MÉTHODE PARTICULIÈRE DE PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES DES ACIDES GRAS AYANT 4 ATOMES DE CARBONE OU PLUS

6.1 Principe

Transestérification des glycérides par réaction avec une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium.

6.2 Réactifs

Sauf indication contraire, tous les réactifs et les solvants doivent être de qualité analytique, et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

6.2.1 Hydroxyde de potassium, solution méthanolique, environ 2 N.

Dissoudre 11,2 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml de méthanol contenant moins de 0,5 % d'eau (*m/m*).

6.2.2 Heptane, pour chromatographie (voir 8.2 et 8.4).

6.2.3 Solution de référence I.

Peser, à 0,1 mg près, environ 1 g de pentanoate de méthyle dans une fiole jaugée de 50 ml. Compléter au trait repère avec de l'heptane (6.2.2).

6.2.4 Solution de référence II.

Peser, à 0,1 mg près, environ 200 mg de pentanoate de méthyle dans une fiole jaugée de 100 ml.

Compléter au trait repère avec de l'heptane (6.2.2).

6.3 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

6.3.1 Tube à essais, capacité 20 ml, muni d'un bouchon rodé en verre.

6.3.2 Fioles jaugées, de 50 ml et 100 ml.

6.3.3 Pipettes graduées, capacité 1 ml ou plus.

6.3.4 Éprouvettes graduées, de 10 ml.

6.4 Mode opératoire

6.4.1 Préparation de l'échantillon pour essai

L'échantillon pour essai doit être sec et limpide. En conséquence, opérer selon l'ISO/R 661, mais en chauffant l'échantillon juste au-dessus de son point de fusion.

6.4.2 Prise d'essai

Peser, à 1 mg près, 1 g d'échantillon pour essai dans le tube à essais (6.3.1).

NOTE — Si l'on ne désire pas déterminer la teneur en acide butyrique, il n'est pas nécessaire de peser la prise d'essai avec la précision mentionnée.

6.4.3 Préparation des esters méthyliques

6.4.3.1 Ajouter dans le tube à essais 10 ml d'heptane (6.2.2) mesurés au moyen d'une éprouvette (6.3.4).

6.4.3.2 Si l'on désire déterminer ultérieurement la teneur exacte en acide butyrique par chromatographie en phase gazeuse et seulement dans ce cas, ajouter à la pipette (6.3.3), dans le tube à essais, 1,0 ml de la solution de référence I (6.2.3) si la teneur présumée en acide butyrique est supérieure à 1 % (*m/m*), ou 1,0 ml de la solution de référence II

(6.2.4), si la teneur présumée en acide butyrique est inférieure à 1 % (m/m).

6.4.3.3 Ajouter 0,5 ml de la solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (6.2.1), boucher le tube à essais et mélanger le contenu du tube en agitant jusqu'à ce que la solution devienne limpide, ce qui demande environ 20 s. Presque aussitôt après la clarification, la solution se trouble à nouveau en raison de la séparation du glycérol, qui se décante rapidement.

Recueillir la couche supérieure qui contient les esters méthyliques.

7 CONSERVATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES

7.1 Les esters doivent, de préférence, être analysés le plus rapidement possible.

Si nécessaire, la solution heptanique contenant les esters méthyliques peut être conservée au réfrigérateur en présence d'un gaz inerte. Pour un stockage de longue durée, il est souhaitable de protéger les esters méthyliques contre l'autoxydation, par addition à la solution d'un antioxygène à une concentration n'interférant pas dans les analyses ultérieures, par exemple 0,05 g/l de BHT (*di-tert* butyl-2,6 méthyl-4 phénol).

Les esters méthyliques contenant du butyrate de méthyle peuvent seulement être conservés dans des ampoules scellées et des précautions spéciales doivent être prises pour prévenir les risques de pertes par évaporation, lors du remplissage et du scellage des ampoules.

7.2 Les esters méthyliques secs et sans solvant doivent être analysés sans retard. Ils peuvent éventuellement être conservés 24 h sous gaz inerte au réfrigérateur, ou plus longtemps en tube scellé sous pression réduite dans un congélateur.

8 REMARQUES SUR LES RÉACTIFS ET LES MODES OPÉRATOIRES

8.1 L'insaponifiable n'est pas éliminé, et, s'il est présent en quantité notable, il peut interférer dans les analyses ultérieures. Dans ce cas, compléter les méthodes par les opérations suivantes :

Diluer avec de l'eau la solution obtenue après saponification, et éliminer l'insaponifiable par extraction à l'oxyde diéthylique, l'hexane ou l'éther de pétrole. Acidifier la solution et séparer les acides gras. Préparer les esters méthyliques de ceux-ci, selon les procédés 4.4.3.2 ou 5.2.4.3.2.

8.2 Les divers réactifs et solvants ne doivent pas produire de pics pouvant interférer avec ceux des esters méthyliques des acides gras lors de la chromatographie en phase gazeuse. Lors de la chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques, certains réactifs et notamment des solutions méthanoliques de trifluorure de bore peuvent conduire à l'apparition de pics parasites (dans la région C₂₀ – C₂₂ pour les solutions méthanoliques de trifluorure de bore).

Par conséquent, chaque nouveau lot du réactif ou du solvant doit être testé en préparant des esters méthyliques de l'acide oléique pur puis en chromatographiant ceux-ci. S'il apparaît un pic parasite, le réactif en cause doit être remplacé.

8.3 S'il est absolument indispensable de préparer une solution méthanolique de trifluorure de bore, opérer comme suit : Tarer une fiole de 2 litres contenant 1 litre de méthanol. Refroidir dans un bain d'eau glacée. La fiole restant dans le bain, faire barboter BF₃ provenant d'une bouteille à gaz, par l'intermédiaire d'un tube de verre dans le méthanol jusqu'à absorption de 125 g, en opérant sous une hotte. Faire passer le courant de BF₃ dans le tube de verre avant de plonger celui-ci dans le méthanol et jusqu'à ce qu'il soit retiré, afin de prévenir tout retour de liquide dans le système détenteur de gaz. Le gaz ne devrait pas, en s'échappant trop vite de la fiole, donner de fumées blanches. Le réactif est stable 2 ans, s'il est conservé dans un réfrigérateur.

8.4 L'heptane peut être remplacé par de l'hexane en l'absence d'acides gras à 20 atomes de carbone ou plus.

8.5 Si l'on ne dispose pas de la masse de prise d'essai prévue, celle-ci peut être réduite jusqu'à 10 mg et même moins, à condition de diminuer proportionnellement les volumes de réactifs et les dimensions des appareils.

8.6 Il y a un risque de perdre une partie des esters les plus volatils si l'élimination du solvant est prolongée, ou si le courant d'azote utilisé est trop violent.

Pour la spectrophotométrie infra-rouge, l'élimination du solvant doit être la plus complète possible. Pour la chromatographie en phase gazeuse, et en présence d'acides gras à 8 atomes de carbone ou moins, le solvant ne doit pas être éliminé.

8.7 Dans le cas d'huiles solubles dans le méthanol (telles que l'huile de ricin), aucune gouttelette d'huile ne sera observée et en conséquence la limpidité ne constitue par un critère permettant de conclure que la réaction est complète.

8.8 Si les acides gras doivent être déterminés quantitativement par chromatographie en phase gazeuse en utilisant un étalon interne, il est nécessaire de peser la prise d'essai avec précision (soit à 1 mg près).