
**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

**iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)**

[ISO 5509:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 5509:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000>

© ISO 2000

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 734 10 79
E-mail copyright@iso.ch
Web www.iso.ch

Imprimé en Suisse

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale 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.

La Norme internationale ISO 5509 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 5509:1978), dont elle constitue une révision technique.

L'annexe A constitue un élément normatif de la présente Norme internationale. L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

L'ISO 5509 décrit trois modes opératoires différents destinés à la préparation des esters méthyliques.

La méthode générale est la méthode au BF_3 , qui peut s'appliquer aux corps gras et aux acides gras libres, mais qui convient moins bien à l'acide caproïque (C6) et ne s'applique pas à l'acide butyrique (C4). Le domaine d'application est la CPG, la CCM et l'IR.

Deux méthodes alternatives ne faisant pas intervenir le BF_3 sont présentées, utilisant l'hydroxyde de triméthylsulfonium et l'hydroxyde de potassium dans le méthanol. Toutes deux sont des méthodes rapides destinées uniquement à l'analyse par CPG.

La deuxième méthode (méthode à l'hydroxyde de triméthylsulfonium), destinée uniquement à l'analyse par CPG, peut être employée pour tous les corps gras, y compris les corps gras laitiers et les corps gras laitiers en mélange. Dans le cas des acides gras à chaînes courtes (C4 à C8), il est conseillé d'avoir recours à un étalon interne.

La troisième méthode (méthode de transestérification), qui peut s'appliquer aux corps gras neutres, est également utilisable pour l'analyse quantitative des corps gras contenant des acides gras à chaînes courtes descendant jusqu'à l'acide butyrique (C4). La méthode utilisant l'étalon interne est maintenue uniquement dans le cas de la détermination de C4 et/ou de C6.

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
Principalement, la nouvelle approche abordée dans la présente révision consiste à employer l'iso-octane comme solvant, au lieu de l'hexane ou du pentane. Cette méthode repose sur les publications référencées [1] et [2] qui démontrent que l'on obtient de meilleurs résultats, notamment pour la méthode au BF_3 , lorsque l'iso-octane est utilisé.

ISO 5509:2000

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000>

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

1 Domaine d'application

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

Elle comprend des méthodes de préparation des esters méthyliques d'acides gras à partir des corps gras d'origines animale et végétale, des acides gras et des savons. Afin de répondre à différentes exigences, trois méthodes de méthylation sont spécifiées, à savoir:

- a) la méthode au trifluorure de bore (BF_3) (voir l'article 3);
- b) la méthode à l'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH) (voir l'article 4);
- c) la méthode de transestérification (voir l'article 5).

Les esters méthyliques ainsi obtenus peuvent être utilisés dans diverses méthodes d'analyse exigeant des produits dérivés de ce type, telles que la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en couche mince (CCM) ou la spectrométrie à infrarouge (IR).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000>

2 Références normatives

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000>

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 661, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation de l'échantillon pour essai.*

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai.*

3 Méthode générale utilisant le trifluorure de bore

AVERTISSEMENT — La méthode décrite implique l'utilisation de réactifs présentant un danger potentiel. Les précautions habituelles doivent être prises pour la protection des yeux et contre les risques de brûlures par les produits chimiques corrosifs.

Le trifluorure de bore est un composé toxique. C'est pourquoi il n'est pas recommandé à l'analyste de préparer la solution méthanolique de trifluorure de bore à partir de méthanol et de trifluorure de bore. (Voir l'article A.1 de l'annexe A.)

3.1 Principe

Saponification des glycérides avec de l'hydroxyde de sodium méthanolique. Conversion des savons en esters méthyliques par réaction avec un complexe de trifluorure de bore/méthanol.

Dans le cas d'analyses portant sur des acides gras purs et des savons, la saponification à l'hydroxyde de sodium n'est pas nécessaire et les esters peuvent être préparés directement par réaction avec le trifluorure de bore.

3.2 Champ d'application

Cette méthode est recommandée pour la plupart des corps gras et produits dérivés (acides gras, savons), à l'exception des corps gras laitiers et des graisses renfermant des acides gras avec des groupes spécifiques.

Durant l'estérification, les composés contenant les configurations suivantes peuvent subir une décomposition totale ou partielle:

- groupes céto, époxy, hydroxy, hydroperoxy;
- groupes cyclopropyliques et cyclopropényliques;
- acides gras acétyléniques.

Si la matière grasse ne renferme de tels composés qu'en très faible proportion (par exemple l'huile de coton), la méthode peut être utilisée; dans le cas contraire, il convient d'adopter la méthode décrite à l'article 4 ou à l'article 5.

Dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse, les esters méthyliques issus du mélange réactif sont récupérés de façon optimale avec l'iso-octane. Toutefois, le caproate de méthyle (C6) présent n'est récupéré qu'à concurrence de 75 % environ.

3.3 Réactifs

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37abc0ea-3e75-4531-bb43-c6912f85a0c5/iso-5509-2000>

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

3.3.1 Eau, de qualité 3, conformément à l'ISO 3696.

3.3.2 Hydroxyde de sodium, solution méthanolique, à environ 0,5 mol/l.

Dissoudre 2 g d'hydroxyde de sodium dans 100 ml de méthanol contenant au plus 0,5 % (fraction massique) d'eau. En cas de conservation nécessaire de la solution pendant une longue période, une petite quantité de précipité blanc de carbonate de sodium est susceptible de se former; ce phénomène n'influe pas sur la préparation des esters méthyliques.

3.3.3 Trifluorure de bore (BF₃), solution méthanolique, de 12 % à 15 % (fraction massique)¹⁾. Voir l'article A.1.

3.3.4 Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane), de qualité chromatographique. Voir l'article A.2.

AVERTISSEMENT — L'iso-octane est un produit inflammable et présente un risque incendie. Il explose spontanément au contact de l'air à une concentration comprise entre 1,1 % (fraction volumique) et 6,0 % (fraction volumique). Il est très toxique à l'ingestion comme à l'inhalation. Manipuler ce solvant sous une hotte aspirante en bon état de marche.

3.3.5 Chlorure de sodium, solution aqueuse saturée.

1) Des solutions à 14 %, à 20 % (produit fourni par Merck, réf. 8.01663) et à 50 % sont disponibles dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale 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.

3.3.6 Sulfate de sodium, anhydre.

3.3.7 Azote, à teneur en oxygène inférieure à 5 mg/kg.

3.3.8 Hexane, de qualité chromatographique, destiné uniquement aux esters méthyliques secs. Voir l'article A.2. Il est possible d'utiliser de l'éther de pétrole ayant un point d'ébullition compris entre 40 °C et 60 °C, redistillé et exempt de résidus, et présentant un indice de brome inférieur à 1.

3.3.9 Rouge de méthyle, solution à 1 g/l dans de l'éthanol à 60 % (fraction volumique).

3.4 Appareillage

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

3.4.1 Ballon, de 50 ml ou 100 ml de capacité, à col rond et équipé d'un bouchon en verre rodé.

3.4.2 Réfrigérant à reflux, de 20 cm à 30 cm de longueur utile, équipé d'un rodage adaptable au ballon (3.4.1).

3.4.3 Régulateur d'ébullition, exempt de matières grasses.

3.4.4 Pipette graduée, d'une contenance d'au moins 10 ml et munie d'une poire pour pipette, ou **pipette automatique**.

3.4.5 Flacon, de 4 ml de capacité, muni d'un bouchon à vis.

3.4.6 Ampoules à décanter, de 250 ml de capacité, destinées uniquement aux esters méthyliques secs.

3.4.7 Évaporateur rotatif.

3.4.8 Balance analytique, capable de peser à 0,001 g près.

3.5 Préparation de l'échantillon pour essai

L'échantillon pour essai doit être liquide, sec et limpide. Opérer conformément à l'ISO 661, mais en chauffant l'échantillon juste au-dessus de son point de fusion.

3.6 Mode opératoire

AVERTISSEMENT — En raison du caractère toxique du trifluorure de bore, réaliser la méthylation sous une hotte ventilée. Il est primordial de nettoyer toute la verrerie avec de l'eau immédiatement après emploi.

3.6.1 Prise d'essai

Consulter le Tableau 1 pour sélectionner les dimensions adéquates des ballons ainsi que les quantités de réactifs et de solvants nécessaires à la méthylation de la prise d'essai choisie.

Tableau 1

Procédé	Prise d'essai mg	Ballon (3.4.1) ml	Solution de NaOH (3.3.2) ml	Solution de BF ₃ (3.3.3) ml	Solvant (3.3.4) ou (3.3.8) ml
CPG	100 à 250	50	4	5	1 à 3
	250 à 500	50	6	7	2 à 5
IR/CCM	500 à 750	100	8	9	4 à 8
	750 à 1 000	100	10	12	7 à 10

3.6.2 Saponification

3.6.2.1 Dans le cas des corps gras, commencer la méthode en 3.6.2.2.

Dans le cas des acides gras et des savons, commencer la méthode en 3.6.2.3.

3.6.2.2 Introduire la prise d'essai dans le ballon approprié. Voir le Tableau 1 et l'annexe A. Ajouter la quantité adéquate (voir Tableau 1) de solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (3.3.2) ainsi que le régulateur d'ébullition (3.4.3). Adapter le réfrigérant (3.4.2) au ballon.

En présence d'acides gras contenant plus de deux doubles liaisons, éliminer l'air contenu dans le ballon par barbotage d'azote sec (3.3.7) dans la solution, pendant quelques minutes juste avant le reflux.

Porter à ébullition sous reflux jusqu'à disparition des gouttelettes de matière grasse, en tournant doucement le ballon toutes les 30 s à 1 min afin d'éviter qu'un anneau solide d'hydroxyde de sodium ne se forme sur les parois du ballon. La durée de cette opération oscille généralement entre 5 min et 10 min, mais dans certains cas exceptionnels, cela peut prendre plus de temps. Voir les articles A.3 et A.4. Ajouter la quantité appropriée (voir Tableau 1) de solution méthanolique de trifluorure de bore (3.3.3) par le haut du réfrigérant.

Procéder comme indiqué en 3.6.3 ou en 3.6.4, selon les cas.

3.6.2.3 Introduire la prise d'essai dans le ballon approprié (voir Tableau 1). Ajouter dans le ballon la quantité adéquate (voir Tableau 1) de solution méthanolique de trifluorure de bore (3.3.3). Adapter le réfrigérant (3.4.2) au ballon.

Procéder comme indiqué en 3.6.3 ou en 3.6.4, selon les cas.

3.6.3 Préparation des esters méthyliques en solution d'iso-octane (principalement pour les besoins de la chromatographie en phase gazeuse)

3.6.3.1 Poursuivre l'ébullition pendant 3 min. Dans le cas des huiles contenant de longues chaînes d'acides gras, telles que les huiles de poisson, poursuivre l'ébullition durant 30 min.

3.6.3.2 Ajouter, dans le mélange en ébullition, la quantité appropriée (voir Tableau 1) d'iso-octane (3.3.4) par le haut du réfrigérant.

3.6.3.3 Retirer le ballon de la source de chaleur et débrancher le réfrigérant à reflux. Ajouter IMMÉDIATEMENT, sans laisser le ballon refroidir, 20 ml de solution de chlorure de sodium (3.3.5). Boucher le ballon et agiter vigoureusement celui-ci pendant au moins 15 s.

3.6.3.4 Poursuivre l'ajout de solution saturée de chlorure de sodium (3.3.5) afin d'amener la hauteur du liquide au niveau du col du ballon. Laisser s'opérer la séparation des deux phases.

3.6.3.5 Transvaser 1 ml à 2 ml de la couche supérieure d'iso-octane dans un flacon de 4 ml (3.4.5) et ajouter une petite quantité de sulfate de sodium anhydre (3.3.6) pour éliminer les traces d'eau.

La solution d'iso-octane ainsi obtenue peut être injectée de la manière suivante:

- a) directement dans la colonne remplie [pour la chromatographie en phase gazeuse (voir l'article A.5)];
- b) après dilution appropriée avec de l'iso-octane, avant injection [pour les systèmes à colonnes capillaires (voir l'article A.6)];
- c) après dilution de la solution à l'aide d'un solvant à point d'ébullition moins élevé, tel que l'heptane (dans le cas particulier de l'injection «on column»).

3.6.4 Préparation des esters méthyliques secs (pour CCM ou spectroscopie IR)

3.6.4.1 Poursuivre l'ébullition pendant 3 min.

3.6.4.2 Ajouter, dans le mélange en ébullition, la quantité appropriée (voir Tableau 1) d'hexane (3.3.8) par le haut du réfrigérant.

3.6.4.3 Retirer le ballon de la source de chaleur et débrancher le réfrigérant à reflux. Ajouter IMMÉDIATEMENT, sans laisser le ballon refroidir, 20 ml de solution de chlorure de sodium (3.3.5). Boucher le ballon et agiter vigoureusement celui-ci pendant au moins 15 s.

3.6.4.4 Transvaser la solution saline et la couche d'hexane dans une ampoule à décanter de 250 ml (3.4.6). Ajouter environ 30 ml de solution saturée de chlorure de sodium. Laisser s'opérer la séparation des deux phases. Retenir la solution d'hexane. Extraire à deux reprises la solution saline à l'aide de portions d'hexane (3.3.8) de 50 ml.

3.6.4.5 Réunir la solution d'hexane ainsi que les deux extraits et les laver avec des portions de 20 ml d'eau (3.3.1) jusqu'à ce qu'un acide libre ne soit plus obtenu, en utilisant comme indicateur la solution de rouge de méthyle (3.3.9).

Sécher avec du sulfate de sodium anhydre (3.3.6). Filtrer la solution et faire évaporer le solvant avec précaution, sur un bain d'eau sous courant d'azote (3.3.7), ou à l'aide de l'évaporateur rotatif (3.4.7).

Si la portion résiduelle contient une quantité considérable d'esters méthyliques à chaînes courtes (C6 à C10), il est difficile d'éviter que des pertes substantielles de ces dernières ne se produisent. Dans le cas de prises d'essai inférieures à 500 mg, il est préférable de réduire proportionnellement les volumes de solution de chlorure de sodium, de solvant et d'eau. Voir l'article A.6.

4 Méthode à l'hydroxyde de triméthylsulfonium (méthode TMSH)

ISO 5509:2000

AVERTISSEMENT — La méthode décrite implique l'utilisation de réactifs présentant un danger potentiel. Les précautions habituelles doivent être prises pour la protection des yeux et contre les risques de brûlures par les produits chimiques corrosifs. Dans certaines conditions, l'hydroxyde de triméthylsulfonium peut être toxique.

4.1 Principe

Dissolution de l'échantillon pour essai dans de l'éther de méthyle *t*-butyle et préparation des esters méthyliques par transestérification avec de l'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH). Injection immédiate dans le chromatographe en phase gazeuse, à une température d'injection supérieure à 250 °C. En présence d'acides gras à chaînes courtes (4 à 8 atomes de carbone), il est conseillé d'utiliser de l'ester méthylique d'acide pentanoïque (valérique) comme étalon interne (voir 4.2).

4.2 Champ d'application

Cette méthode rapide est uniquement valable pour la préparation des esters méthyliques destinés à la CPG. Elle convient à tous les corps gras, y compris les corps gras laitiers et les corps gras laitiers en mélange. L'isomérisation des acides gras non saturés n'a pas été observée.

La méthode peut être appliquée aux composés contenant les configurations chimiques énumérées en 3.2, mais on ignore s'il y a une conversion totale en esters méthyliques. De même, les acides gras libres ne sont estérifiés qu'à hauteur de 70 % à 80 % environ.

Les lipides contenant des groupes hydroxy sont en partie convertis dans leurs dérivés esters méthyliques O correspondants, ce qui peut interférer avec les esters méthyliques d'acides gras (FAME) pendant la séparation chromatographique CPG. La méthode de dérivation TMSH n'est de ce fait pas recommandée s'il n'y a pas de limite fixée à la quantité de lipides contenant des groupes hydroxy. D'autre part, elle peut avoir une certaine valeur de diagnostic pour l'analyse de ces lipides par CPG couplée à la spectrométrie de masse.

La méthode TMSH ne peut être appliquée si l'analyse CPG se fait par injection directement sur la colonne. Il n'est pas recommandé d'utiliser des phases stationnaires polaires (cyanopropyl siloxanes).

Pour la détermination des acides gras à chaînes courtes (C4 à C8), il est conseillé d'utiliser de l'ester méthylique d'acide valérique (pentanoate de méthyle) comme étalon interne, à condition que l'échantillon lui-même ne contienne pas d'acide valérique.

4.3 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

4.3.1 Éther de méthyle *t*-butyle.

4.3.2 Hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH)²⁾, solution méthanolique, à 0,2 mol/l.

La solution reste stable pendant au moins deux mois si elle est conservée à 4 °C en petites quantités, à l'intérieur d'un tube fermé.

NOTE La référence [3] donne une méthode pour la préparation du TMSH.

4.3.3 Solution-mère d'étalon interne, destinée uniquement à la détermination de l'acide butyrique et/ou caproïque.

Peser, à 0,1 mg près, environ 250 mg de pentanoate de méthyle dans une fiole graduée de 50 ml. Utiliser de l'iso-octane pour dissoudre l'échantillon et diluer jusqu'au trait.

4.3.4 Solution de référence d'étalon interne, destinée uniquement à la détermination de l'acide butyrique et/ou caproïque.

Ajouter 10 ml de solution-mère (4.3.3) dans une fiole graduée de 100 ml et diluer jusqu'au trait avec de l'iso-octane. Calculer la concentration de cette solution de référence. Voir l'article A.8.

4.3.5 Éther de pétrole.

4.3.6 Sulfate de sodium, anhydre.

4.4 Appareillage

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

4.4.1 Tubes à essai, de 2 ml de capacité, munis de bouchons en verre rodés (flacons autoéchantillonneurs).

4.4.2 Pipettes graduées, de 1 000 µl de capacité.

4.4.3 Fioles graduées, de 50 ml et 100 ml de capacité.

4.4.4 Papier-filtre ondulé.

4.4.5 Évaporateur rotatif.

2) L'hydroxyde de triméthylsulfonium est un produit commercial (réf. 70152) disponible auprès de Machery-Nagel GmbH, D-5213 Düren. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale 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.

4.5 Préparation de l'échantillon pour essai

L'échantillon pour essai doit être liquide, sec et limpide. Opérer conformément à l'ISO 661, mais en chauffant l'échantillon juste au-dessus de son point de fusion.

4.6 Mode opératoire

4.6.1 Prise d'essai

Peser $10 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ de la prise d'essai dans un tube à essai (4.4.1).

Si la teneur en eau des échantillons est plus élevée, utiliser une prise d'essai plus importante.

Faire fondre les échantillons solides avec précaution, à une température supérieure d'environ $10 \text{ }^\circ\text{C}$ à leur point de fusion et homogénéiser. Éviter les chaleurs excessives.

Dissoudre les échantillons contenant de l'eau dans de l'éther de pétrole (4.3.5) et les sécher pendant 30 min en ajoutant du sulfate de sodium anhydre (4.3.6). Éliminer l'agent de séchage par filtration à travers un papier-filtre ondulé et laver soigneusement le résidu avec de l'éther de pétrole. Éliminer le solvant au moyen d'un évaporateur rotatif (4.4.5).

4.6.2 Préparation des esters méthyliques

4.6.2.1 À l'aide d'une pipette (4.4.2), ajouter $500 \text{ }\mu\text{l}$ d'éther de méthyle *t*-butyle et dissoudre l'échantillon, en chauffant modérément si nécessaire.

Pour la détermination des acides butyrique et/ou caproïque, remplacer les $500 \text{ }\mu\text{l}$ d'éther de méthyle *t*-butyle par $500 \text{ }\mu\text{l}$ de la solution de référence d'étalon interne (4.3.4).

4.6.2.2 À l'aide d'une pipette (4.4.2), ajouter à cette solution $250 \text{ }\mu\text{l}$ de solution de TMSH (4.3.2) et agiter vigoureusement pendant environ 30 s. Voir l'article A.7.

4.6.2.3 La solution obtenue (4.6.2.2) est prête pour l'injection dans le chromatographe en phase gazeuse. Du fait que les esters méthyliques ne se forment que pendant l'injection, il est nécessaire que la température de l'injecteur soit d'au moins de $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Voir les articles A.2 et A.7.

S'il s'avère nécessaire de diluer la solution avant l'injection, utiliser un mélange d'éther de méthyle *t*-butyle (4.3.1) et de méthanol (9+1) pour éviter un précipité de TMSH.

5 Méthode de transestérification

AVERTISSEMENT — La méthode décrite implique la manipulation de réactifs potentiellement dangereux. Les mesures habituelles de protection doivent être prises tant pour les yeux que pour éviter tout risque de brûlures par produits chimiques corrosifs. La solution méthanolique d'hydroxyde de potassium est toxique.

5.1 Principe

Dissolution des glycérides dans l'iso-octane et conversion en esters méthyliques par transestérification avec de l'hydroxyde de potassium. Une fois la réaction terminée, neutralisation de l'hydroxyde de potassium avec de l'hydrogénosulfate de sodium, afin d'éviter la saponification des esters méthyliques.

5.2 Champ d'application

Cette méthode rapide est applicable aux corps gras comestibles contenant des acides gras descendant jusqu'à C4, dont la teneur en acides gras libres (FFA) n'excède pas 2 % et qui sont destinés à la détermination de l'acide butyrique (C4) ou caproïque (C6) par CPG à l'aide d'un étalon interne.

Dans le cas d'échantillons présentant une teneur en FFA supérieure, il convient d'utiliser de l'hydroxyde de potassium en excès. Étant donné que les acides gras libres et les savons ne sont pas estérifiés par l'hydroxyde de potassium, la méthode est utilisable uniquement pour obtenir les esters méthyliques de la portion de glycérides contenue dans l'échantillon.

La méthode peut être appliquée aux composés contenant les configurations chimiques énumérées en 3.2, mais on ignore s'il y a une conversion totale en esters méthyliques.

5.3 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.3.1 Hydroxyde de potassium, solution méthanolique, à environ 2 mol/l.

Du fait que l'hydroxyde de potassium contient en pratique environ 15 % d'eau, procéder comme suit.

Dissoudre, en chauffant modérément, 13,1 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml de méthanol absolu.

Ajouter à la solution une quantité de sulfate de sodium anhydre permettant de la sécher. Filtrer pour obtenir une solution limpide. En cas de conservation nécessaire de la solution pendant une longue période, une petite quantité de précipité blanc de carbonate de sodium est susceptible de se former; ce phénomène n'influe pas sur la préparation des esters méthyliques, à condition d'utiliser le liquide limpide surnageant.

5.3.2 Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane), de qualité chromatographique. Voir l'article A.2.

5.3.3 Hydrogénosulfate de sodium monohydraté.

5.3.4 Solution-mère d'étalon interne, destinée uniquement à la détermination de l'acide butyrique et/ou caproïque.

Peser, à 0,1 mg près, environ 250 mg d'ester méthylique d'acide valérique (pentanoate de méthyle) dans une fiole graduée de 50 ml. Utiliser de l'iso-octane (5.3.2) pour dissoudre l'échantillon et diluer jusqu'au trait.

5.3.5 Solution de référence d'étalon interne, destinée uniquement à la détermination de l'acide butyrique et/ou caproïque.

Ajouter 10 ml de solution-mère (5.3.4) dans une fiole graduée de 100 ml et diluer jusqu'au trait avec de l'iso-octane (5.3.2). Calculer la concentration de cette solution de référence. Voir l'article A.8.

5.4 Appareillage

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

5.4.1 Tube à essai, de 5 ml de capacité, muni d'un bouchon en verre rodé.

5.4.2 Pipette graduée ou distributeur, de 4 ml de capacité, et/ou une pipette volumétrique de 4 ml de capacité.

5.4.3 Pipette, de 200 µl de capacité, ou pipette automatique.

5.4.4 Flacon, de 4 ml de capacité, muni d'un bouchon à vis.

5.4.5 Fioles graduées, de 50 ml et 100 ml de capacité.