
Norme internationale



6800

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

**Corps gras d'origines animale et végétale —
Détermination de la composition des acides gras en
position 2**

Animal and vegetable fats and oils — Determination of the composition of fatty acids in the 2-position

Première édition — 1985-12-15

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 créé à cet effet. 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. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6800 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la composition des acides gras en position 2

1 Objet

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination dans les corps gras d'origines animale et végétale de la composition de la fraction des acides gras en position 2 (position β ou position interne) dans les glycérides.

2 Domaine d'application

En raison des particularités d'action de la lipase pancréatique, la méthode s'applique seulement aux corps gras ayant un point de fusion inférieur à 45 °C.

Elle n'est pas applicable sans restrictions à tous les corps gras, en particulier à ceux renfermant des quantités importantes

- soit d'acides gras ayant 12 atomes de carbone ou moins (huiles de coprah et de palmiste, matières grasses butyriques du beurre);
- soit d'acides gras ayant 20 atomes de carbone et plus et d'insaturation élevée (plus de quatre doubles liaisons) (huiles de poissons et d'animaux marins);
- soit d'acides gras possédant des fonctions oxygénées secondaires.

3 Références

ISO 660, *Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de l'indice d'acide et de l'acidité.*

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

ISO 5508, *Corps gras d'origines animale et végétale — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras.*

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

ISO 5555, *Corps gras d'origines animale et végétale — Échantillonnage.*

4 Principe

Après neutralisation éventuelle des acides gras libres, purification de la prise d'essai par chromatographie sur colonne. Hydrolyse enzymatique partielle des glycérides pour obtenir les mono-2 glycérides. Séparation des monoglycérides par chromatographie sur couche mince et détermination de leur composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

5 Réactifs

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de pureté équivalente.

5.1 Réactifs pour la purification de la prise d'essai

5.1.1 Propanol-2 ou éthanol, à 95 % (V/V).

5.1.2 Hexane ou, à défaut, éther de pétrole (intervalle de distillation 30 à 60 °C).

5.1.3 Propanol-2, à 50 % (V/V) ou éthanol, à 50 % (V/V).

5.1.4 Hydroxyde de sodium, solution à 0,5 mol/l.

5.1.5 Phénolphtaléine, solution à 1 g pour 100 ml dans l'éthanol à 95 % (V/V).

5.1.6 Alumine activée pour chromatographie, neutre, de degré d'activité Brockmann I, récemment activée pendant 2 h à 260 °C et conservée dans un dessiccateur.

5.1.7 Azote.

5.2 Réactifs pour l'hydrolyse des triglycérides

5.2.1 Oxyde diéthylique, exempt de peroxydes.

5.2.2 Acide chlorhydrique, solution à 6 mol/l.

5.2.3 Cholate de sodium, solution à 1 g/l, de qualité enzymatique.

5.2.4 Chlorure de calcium, solution à 220 g/l de CaCl₂.

5.2.5 Solution tampon, de amino-2 hydroxyméthyl-2 propane diol-1,3,¹⁾ à 1 mol/l, amenée à pH 8 par de l'acide chlorhydrique à 6 mol/l (5.2.2) en utilisant un pH-mètre.

Conserver cette solution entre 0 et 4 °C et l'utiliser dans les 14 jours après préparation.

5.2.6 Lipase pancréatique, ayant une activité comprise entre 8 et 20 unités par milligramme (voir annexe).

Elle doit être conservée déshydratée au réfrigérateur. Avant utilisation pour l'analyse, une partie de la poudre doit être portée à la température ambiante.

NOTE — Il existe dans le commerce des lipases ayant une activité lipasique satisfaisante. Si l'on préfère, la lipase peut être préparée et contrôlée selon la technique décrite en annexe.

5.3 Réactifs pour l'isolement des mono-2 glycérides

5.3.1 Éthanol.

5.3.2 Hexane ou, à défaut, **éther de pétrole** (intervalle de distillation 30 à 60 °C).

5.3.3 Acétone.

5.3.4 Silice en poudre, avec liant, pour chromatographie en couche mince.

5.3.5 Solvant de développement, préparé comme suit :

hexane ou, à défaut, éther de pétrole	70 ml
oxyde diéthylique	30 ml
acide formique à 98 % (V/V) minimum	1 ml

5.3.6 Révélateur : solution méthanolique à 2 g/l de dichloro-2', 7' fluorescéine, légèrement alcalinisée par addition d'une goutte d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l pour 100 ml de solution.

5.4 Réactifs pour l'analyse des mono-2 glycérides par chromatographie en phase gazeuse

Voir ISO 5508 et ISO 5509.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment

6.1 Appareillage pour la purification de la prise d'essai

6.1.1 Bain d'eau thermostatique, réglé à une température comprise entre 30 et 40 °C.

6.1.2 Colonne en verre, pour chromatographie, de 13 mm de diamètre intérieur et 400 mm de longueur, équipée d'une plaque en verre fritté et d'un robinet.

6.1.3 Évaporateur rotatif, avec ballon de 250 ml.

6.1.4 Tubulure, pour barbotage d'azote.

6.1.5 Ampoule à décanter, de 500 ml.

6.1.6 Ballon, de 100 ml de capacité.

6.2 Appareillage pour l'hydrolyse des triglycérides

6.2.1 Centrifugeuse (si nécessaire).

6.2.2 Tube de centrifugeuse, de 10 ml, avec bouchon rodé.

6.2.3 Agitateur électrique vibrant, permettant une agitation énergétique du tube de centrifugeuse.

6.2.4 Bain d'eau thermostatique, réglable à 40 ± 0,5 °C.

6.2.5 Seringue hypodermique, de 1 ml, munie d'une aiguille mince.

6.2.6 Chronomètre.

6.3 Appareillage pour l'isolement des mono-2 glycérides

6.3.1 Cuve de développement, pour chromatographie en couche mince, avec couvercle en verre rodé, susceptible de contenir des plaques en verre de 200 mm × 200 mm.

6.3.2 Étaleur et socle, pour la préparation des plaques.

6.3.3 Plaques en verre, de 200 mm × 200 mm.

6.3.4 Microseringue, permettant de délivrer uniformément en une bande continue des gouttelettes de 3 à 4 µl.

6.3.5 Appareil pour pulvériser le révélateur sur les plaques

6.3.6 Microspatule.

1) Autres désignations : tris-(hydroxyméthyl) méthylamine; tris-(hydroxyméthyl) aminométhane.

6.3.7 Étuve, réglable à 103 ± 2 °C.

6.3.8 Lampe U.V., pour l'examen des plaques chromatographiques, de par exemple 254 nm de longueur d'onde.

6.3.9 Ballon, de 25 ml, avec réfrigérant à air, d'environ 1 m de longueur avec raccord rodé.

6.3.10 Fiole conique, de 250 ml à bouchon rodé.

6.3.11 Fiole conique, de 50 ml (éventuellement).

6.3.12 Filtre, en verre fritté, de porosité P 40 (16 à 40 μ m) (éventuellement).

6.3.13 Dessiccateur.

6.4 Appareillage pour l'analyse des mono-2 glycérides par chromatographie en phase gazeuse

Voir ISO 5508 et ISO 5509.

7 Échantillonnage

Voir ISO 5555.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai à partir de l'échantillon pour laboratoire conformément à l'ISO 661.

8.2 Détermination de l'acidité de l'échantillon pour essai

Déterminer l'acidité de l'échantillon pour essai selon l'ISO 660.

Si l'acidité est inférieure à 3 % (*m/m*), procéder à une purification de l'échantillon par passage sur alumine, selon 8.4.

Si l'acidité est supérieure à 3 % (*m/m*), procéder préalablement à une neutralisation de l'échantillon par l'hydroxyde de sodium en présence de solvant en opérant selon 8.3, puis effectuer une purification par passage sur alumine selon 8.4.

8.3 Neutralisation par l'hydroxyde de sodium

Dissoudre environ 10 g d'échantillon pour essai dans 100 ml d'hexane ou, à défaut, d'éther de pétrole (5.1.2) et verser la solution dans une ampoule à décanter de 500 ml (6.1.5). Ajouter 50 ml de propanol-2 ou d'éthanol à 95 % (*V/V*) (5.1.1), quelques gouttes de phénolphtaléine (5.1.5) et une quantité de la solution d'hydroxyde de sodium (5.1.4) correspondant à

l'acidité libre du corps gras, plus un excès de 0,5 %. Agiter énergiquement pendant 1 min, ajouter 50 ml d'eau, agiter à nouveau et laisser reposer. Après décantation, éliminer la couche inférieure contenant les savons et les éventuelles couches intermédiaires (mucilages et substances insolubles). Laver la solution d'hexane ou d'éther de pétrole de l'huile neutralisée avec des quantités successives de 25 ou 30 ml d'une solution de propanol-2 ou d'éthanol (5.1.3) jusqu'à disparition de la coloration rosée de la phénolphtaléine.

Verser la solution dans le ballon de l'évaporateur rotatif (6.1.3) et éliminer la plus grande partie du solvant par distillation sous pression réduite. Sécher l'huile à 30-40 °C sous pression réduite à l'aide d'un courant d'azote (5.1.7), jusqu'à élimination totale du solvant.

8.4 Purification de la prise d'essai sur alumine

Préparer une suspension de 15 g d'alumine activée (5.1.6) dans 50 ml d'hexane ou, à défaut, d'éther de pétrole (5.1.2), et verser, en agitant, dans une colonne en verre pour chromatographie (6.1.2). Régulariser la répartition de l'alumine et laisser s'écouler le solvant jusqu'à 1-2 mm au-dessus du niveau supérieur de l'adsorbant. Verser soigneusement dans la colonne une solution préparée par dissolution de 5 g de prise d'essai, neutralisée si nécessaire, dans 25 ml d'hexane ou, à défaut, d'éther de pétrole (5.1.2), et recueillir la totalité du liquide sortant de la colonne dans un ballon de 100 ml (6.1.6).

Éliminer la plus grande partie du solvant par distillation sous pression réduite, puis sécher l'huile à 30-40 °C à l'aide d'un courant d'azote (5.1.7) jusqu'à élimination totale du solvant.

8.5 Hydrolyse des triglycérides

Peser dans un tube de centrifugeuse de 10 ml (6.2.2) environ 0,1 g de la prise d'essai purifiée (8.4). Si la prise d'essai est solide, mettre le tube dans un bain d'eau maintenu à 60-65 °C jusqu'à liquéfaction ou pendant 40 s au maximum, même si ainsi la prise d'essai n'est pas liquide. Amener la température du tube à environ 40 °C et poursuivre le mode opératoire sans délai.

Placer le tube de centrifugeuse contenant la prise d'essai purifiée, dans un bain d'eau maintenu à $40 \pm 0,5$ °C. Ajouter 2 ml de solution tampon (5.2.5), 0,5 ml de solution de cholate de sodium (5.2.3) et 0,2 ml de solution de chlorure de calcium (5.2.4) et agiter avec précaution. Ajouter 20 mg de lipase (5.2.6), mettre en place le bouchon et secouer manuellement pendant 1 min exactement, le tube étant maintenu dans le bain d'eau.

Retirer le tube du bain et agiter énergiquement pendant 2 min exactement à l'aide de l'agitateur (6.2.3).

Ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique (5.2.2) et 1 ml d'oxyde diéthylique (5.2.1). Boucher et agiter énergiquement à l'aide de l'agitateur (6.2.3). Centrifuger et transférer la phase organique dans un tube à essais, à l'aide de la seringue (6.2.5). Si la prise d'essai était solide à la température ambiante, recommencer l'extraction avec une quantité supplémentaire de 1 ml d'oxyde diéthylique et réunir les extraits dans le tube à essais.

8.6 Isolement des mono-2 glycérides

8.6.1 Préparation des plaques¹⁾

Nettoyer soigneusement les plaques en verre (6.3.3) avec de l'éthanol (5.3.1), ou de l'hexane ou de l'éther de pétrole (5.3.2) et de l'acétone (5.3.3) jusqu'à élimination totale des matières grasses.

Dans une fiole conique de 250 ml (6.3.10) peser 30 g de silice (5.3.4). Ajouter 60 ml d'eau. Boucher et agiter énergiquement pendant 1 min. Introduire aussitôt la pâte dans l'étaleur (6.3.2). Étendre en couche de 0,25 mm d'épaisseur sur les plaques propres. Laisser sécher les plaques pendant au moins 15 min à l'air.

Dans tous les cas, qu'il s'agisse de plaques préparées comme précédemment ou de plaques toutes préparées du commerce, activer les plaques à 103 ± 2 °C dans une étuve (6.3.7) pendant 1 h. Laisser refroidir avant l'emploi les plaques dans un dessiccateur (6.3.13) jusqu'à température ambiante.

NOTE — Certaines silices contenant des produits organiques susceptibles d'interférer avec les acides gras lors de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, il est conseillé de vérifier par un essai à blanc l'absence de telles substances. Sinon, laver préalablement les plaques préparées en les plaçant dans une cuve de développement avec le solvant (5.3.5) qu'on laisse migrer jusqu'en haut de la plaque.

8.6.2 Isolement des mono-2 glycérides

À l'aide d'une microseringue (6.3.4), déposer l'extrait (8.5) sur une plaque préparée (8.6.1) à 15 mm d'un des bords, en une bande continue de fines gouttelettes.

Introduire la plaque dans la cuve de développement (6.3.1), préalablement saturée avec le solvant de développement (5.3.5), mettre le couvercle et développer la plaque jusqu'à ce que le front du solvant arrive à 10 mm du bord supérieur.

Le développement de la plaque doit se faire à la température d'environ 20 °C.

Sécher la plaque à l'air à 20 °C environ et pulvériser le révélateur (5.3.6) à l'aide de l'appareil (6.3.5). Délimiter la bande des monoglycérides ($R_f = 0,035$ environ) sous lumière ultraviolette (6.3.8) et la récupérer à l'aide d'une microspatule (6.3.6) (en évitant d'enlever les composants restés sur la ligne de départ).

Si la prise d'essai purifiée (8.4) était liquide à la température ambiante, recueillir la silice dans le ballon de méthylation de 25 ml (6.3.9) et procéder comme décrit en 8.7.

Si la prise d'essai purifiée (8.4) était solide à la température ambiante, recueillir la silice dans une fiole conique de 50 ml (6.3.11) avec 15 ml d'oxyde diéthylique. Agiter vigoureusement et filtrer la totalité de la silice dans un filtre en verre fritté (6.3.12). Laver le filtre trois fois avec 15 ml d'oxyde diéthylique à chaque fois, et recueillir le filtrat dans un ballon d'évaporation. Évaporer la solution d'oxyde diéthylique jusqu'à obtention d'un résidu de 4 à 5 ml, le transférer dans le ballon de méthylation de 25 ml (6.3.9) préalablement taré, puis évaporer le solvant sous un courant d'azote. Peser le résidu. La quantité de monoglycérides obtenue doit être entre 10 et 30 % de la masse de la prise d'essai, sinon l'hydrolyse des triglycérides (8.5) doit être recommencée ou l'activité de la lipase recontrôlée (voir annexe).

8.7 Analyse des mono-2 glycérides par chromatographie en phase gazeuse

Préparer les esters méthyliques d'acides gras des monoglycérides en traitant directement, selon l'ISO 5509, la silice précédemment recueillie (ou les monoglycérides extraits de la silice), en utilisant la méthode générale au trifluorure de bore ou la méthode de remplacement applicable aux corps gras neutres, puis procéder à la chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques selon l'ISO 5508.

9 Expression des résultats

Calculer la proportion des esters d'acides gras en position 2, en pourcentage en masse des esters d'acides gras totaux des mono-2 glycérides.

Donner les résultats avec une décimale.

10 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et 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 les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

1) On peut se procurer dans le commerce des plaques toutes préparées.