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

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6800:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8af4355f-ea0f-49d7-aa38-bf290cfcef0e/iso-6800-1997>



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 6800 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 6800:1985), dont elle constitue une révision technique.

Les annexes A à C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1997

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'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse
Internet central@iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

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

1 Domaine d'application

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 estérifiés en position 2 (position β ou position interne) dans les triglycérides.

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 (par exemple 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) (par exemple huiles de poissons et d'animaux marins);
- soit d'acides gras possédant des fonctions oxygénées secondaires.

NOTE — Les acides gras avec doubles liens en position ($n-16$) à ($n-11$) (par exemple acide pétrosélinique) ne sont convertis que très lentement par lipase pancréatique, ce qui pourrait donner des résultats erronés.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent 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, les éditions indiquées étaient 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 les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 660:1996, *Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de l'indice d'acide et de l'acidité.*

ISO 661:1989, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation de l'échantillon pour essai.*

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai.*

ISO 5508:1990, *Corps gras d'origine animale et végétale — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras.*

ISO 5509:—¹⁾, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation des esters méthyliques d'acides gras.*

1) À publier. (Révision de l'ISO 5509:1978)

3 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.

4 Réactifs

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique et l'eau utilisée doit être de qualité 2, conformément à l'ISO 3696.

4.1 Réactifs pour la purification de la prise d'essai

- 4.1.1 **Propanol-2** ou **éthanol**, à 95 % (V/V).
- 4.1.2 **Hexane** ou, à défaut, **éther de pétrole** (intervalle de distillation 30 °C à 60 °C).
- 4.1.3 **Propanol-2**, à 50 % (V/V) ou **éthanol**, à 50 % (V/V).
- 4.1.4 **Hydroxyde de sodium**, solution à 0,5 mol/l.
- 4.1.5 **Phénolphaléine**, solution à 1 g pour 100 ml dans l'éthanol à 95 % (V/V).
- 4.1.6 **Alumine activée neutre**, pour chromatographie, de degré d'activité Brockmann I, récemment activée pendant 2 h à 260 °C et conservée dans un dessiccateur.
- 4.1.7 **Azote**.

4.2 Réactifs pour l'hydrolyse des triglycérides

- 4.2.1 **Oxyde diéthylique**, exempt de peroxydes.
- 4.2.2 **Acide chlorhydrique**, solution à 6 mol/l.
- 4.2.3 **Cholate de sodium**, solution à 1 g/l, de qualité enzymatique.
- 4.2.4 **Chlorure de calcium**, solution à 220 g/l de CaCl₂.
- 4.2.5 **Solution tampon**, d'amino-2 hydroxyméthyl-2 propane diol-1,3²⁾, à 1 mol/l, amenée à pH 8 par de l'acide chlorhydrique (4.2.2) en utilisant un pH-mètre.

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

- 4.2.6 **Lipase pancréatique**, ayant une activité comprise entre 8 et 20 unités par milligramme.

Elle doit être conservée déshydratée au réfrigérateur. Avant utilisation pour l'analyse, porter une partie de la poudre 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 A.

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

4.3 Réactifs pour l'isolement des mono-2 glycérides

4.3.1 **Éthanol**, à 95 % (V/V).

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

4.3.3 **Acétone**.

4.3.4 **Silice en poudre**, avec liant, pour chromatographie en couche mince.

4.3.5 **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) min.:	1 ml

4.3.6 **Révéléateur**: 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.

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

Voir ISO 5508 et ISO 5509.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

5.1 Appareillage pour la purification de la prise d'essai

5.1.1 **Bain d'eau thermostatique**, réglable à une température comprise entre 30 °C et 40 °C.

5.1.2 **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.

5.1.3 **Évaporateur rotatif**, avec ballon de 250 ml.

5.1.4 **Tubulure**, pour barbotage d'azote.

5.1.5 **Ampoule à décanter**, de 500 ml de capacité.

5.1.6 **Ballon**, de 100 ml de capacité.

5.2 Appareillage pour l'hydrolyse des triglycérides

5.2.1 **Centrifugeuse**.

5.2.2 **Tube de centrifugeuse**, en verre, de 10 ml de capacité, avec bouchon rodé.

5.2.3 **Agitateur électrique vibrant**, permettant une agitation énergique du tube de centrifugeuse.

5.2.4 **Bain d'eau thermostatique**, réglable à une température de 40 °C ± 0,5 °C.

5.2.5 **Seringue hypodermique**, de 1 ml de capacité, munie d'une aiguille mince.

5.2.6 **Chronomètre**.

5.3 Appareillage pour l'isolement des mono-2 glycérides

5.3.1 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.

5.3.2 Étaleur et socle, pour la préparation des plaques.

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

5.3.4 Microseringue, permettant de délivrer des gouttelettes de 3 µl à 4 µl.

5.3.5 Appareil pour pulvériser le révélateur sur les plaques.

5.3.6 Microspatule.

5.3.7 Étuve, réglable à 130 °C ± 2 °C.

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

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

5.3.10 Fiole conique, de 250 ml de capacité, à bouchon rodé.

5.3.11 Fiole conique, de 50 ml de capacité (éventuellement).

5.3.12 Filtre, en verre fritté, de porosité P 40 (16 µm à 40 µm) (éventuellement).

5.3.13 Dessiccateur, contenant un agent desséchant efficace.

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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

ISO 6800:1997

Voir ISO 5508 et ISO 5509. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8af4355f-ea0f-49d7-aa38-bf290cfcef0e/iso-6800-1997>

6 Échantillonnage

Il est essentiel que l'échantillon envoyé au laboratoire soit vraiment représentatif et qu'il ne soit ni endommagé ni modifié par le transport et le stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Il est recommandé de se référer à la méthode donnée dans l'ISO 5555^[1].

7 Préparation de l'échantillon

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

8 Mode opératoire

NOTE — Dans le cas où il est demandé de vérifier le respect de la prescription de répétabilité (voir 10.2), effectuer deux déterminations séparées conformément à 8.1 à 8.6.

8.1 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 8.3.

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 8.2, puis effectuer une purification par passage sur alumine selon 8.3.

8.2 Neutralisation par l'hydroxyde de sodium

Dissoudre environ 10 g d'échantillon pour essai dans 100 ml d'hexane ou d'éther de pétrole (4.1.2) et verser la solution dans une ampoule à décanter (5.1.5). Ajouter 50 ml de propanol-2 ou d'éthanol (4.1.1), quelques gouttes de solution de phénolphtaléine (4.1.5) et une quantité de la solution d'hydroxyde de sodium (4.1.4) correspondant à l'action 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 ml ou 30 ml d'une solution de propanol-2 ou d'éthanol (4.1.3) jusqu'à disparition de la coloration rosée de la phénolphtaléine.

Verser la solution dans le ballon de l'évaporateur rotatif (5.1.3) et éliminer la plus grande partie du solvant par distillation sous pression réduite. Sécher l'huile de 30 °C à 40 °C sous pression réduite à l'aide d'un courant d'azote (4.1.7), jusqu'à élimination totale du solvant.

8.3 Purification de la prise d'essai sur alumine

Préparer une suspension de 15 g d'alumine activée (4.1.6) dans 50 ml d'hexane ou d'éther de pétrole (4.1.2), et verser, en agitant dans une colonne en verre pour chromatographie (5.1.2). Régulariser la répartition de l'alumine et laisser s'écouler le solvant de 1 mm à 2 mm au-dessus du niveau supérieur de l'absorbant. 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 d'éther de pétrole (4.1.2), et recueillir la totalité du liquide sortant de la colonne dans un ballon de 100 ml (5.1.6).

Éliminer la plus grande partie du solvant par distillation sous pression réduite, puis sécher l'huile de 30 °C à 40 °C à l'aide d'un courant d'azote (4.1.7) jusqu'à élimination totale du solvant.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8af4355f-ea0f-49d7-aa38-bf290cfcef0e/iso-6800-1997>

8.4 Hydrolyse des triglycérides

8.4.1 Peser dans un tube de centrifugeuse de 10 ml (5.2.2) environ 0,1 g de la prise d'essai purifiée (8.3). Si la prise d'essai est solide, mettre le tube dans un bain d'eau maintenu de 60 °C à 65 °C jusqu'à liquéfaction pendant 30 s au maximum. Si la prise d'essai n'est toujours pas liquide, continuer l'immersion pendant 10 s de plus.

Retirer le tube du bain et procéder directement et sans délai aux étapes de la procédure décrites de 8.4.2 à 8.4.5.

8.4.2 Ajouter à la prise d'essai liquéfiée, une quantité pesée au préalable de 20 mg de lipase (4.2.6) et ajouter 2 ml de solution tampon (4.2.5). Agiter avec précaution et ajouter successivement 0,5 ml de solution de cholate de sodium (4.2.3) et 0,2 ml de solution de chlorure de calcium (4.2.4).

Mettre en place le bouchon, agiter avec précaution et placer aussitôt le tube dans le bain d'eau à 40 °C, en continuant à agiter manuellement pendant 60 s ± 2 s au total.

Les actions mentionnées ci-dessus doivent être exécutées en moins de 30 s, sauf pour ce qui concerne l'agitation pendant 60 s ± 2 s.

8.4.3 Retirer le tube du bain et agiter énergiquement à 40 °C pendant 120 s ± 2 s à l'aide de l'agitateur (5.2.3).

8.4.4 Ajouter immédiatement 1 ml d'acide chlorhydrique (4.2.2) et approximativement 1 ml d'oxyde diéthylique (4.2.1). Boucher et agiter énergiquement à l'aide de l'agitateur (5.2.3).

8.4.5 Centrifuger et transférer la phase organique dans un tube à essais, à l'aide de la seringue (5.2.5). 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.

8.5 Isolement des mono-2 glycérides

8.5.1 Préparation des plaques

NOTE — Il existe des plaques prêtes à l'emploi dans le commerce.

Nettoyer soigneusement les plaques en verre (5.3.3) avec de l'éthanol (4.3.1), ou de l'hexane ou de l'éther de pétrole (4.3.2) et de l'acétone (4.3.3) jusqu'à élimination totale des matières grasses.

Dans une fiole conique de 250 ml (5.3.10) peser 30 g de silice (4.3.4). Ajouter 60 ml d'eau. Boucher et agiter énergiquement pendant 1 min. Introduire aussitôt la pâte dans l'étaleur (5.3.2). Étendre en couche de 0,25 mm d'épaisseur sur les plaques propres. Laisser sécher les plaques pendant au moins 1 h à l'air.

Dans tous les cas, qu'il s'agisse de plaques séparées comme précédemment ou de plaques toutes préparées du commerce, activer les plaques dans l'étuve (5.3.7) réglée à 103 °C pendant 1 h. Laisser refroidir avant l'emploi les plaques dans un dessiccateur (5.3.13) jusqu'à température ambiante.

Afin d'éviter les migrations d'acyle, les plaques de silice doivent être imprégnées d'acide borique. Le mélange réactif doit être séparé par TLC le plus tôt possible.

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 (4.3.5) qu'on laisse migrer jusqu'en haut de la plaque.

8.5.2 Isolement des mono-2 glycérides

À l'aide d'une microsiringue (5.3.4), déposer l'extrait (8.4.5) sur une plaque préparée (8.5.1) à 15 mm d'un des bords, en une bande continue de fines gouttelettes.

Introduire la plaque dans la cuve de développement (5.3.1), préalablement saturée avec le solvant de développement (4.3.5), 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 (4.3.6) à l'aide de l'appareil (5.3.5). Délimiter la bande des monoglycérides ($R_f = 0,035$ environ) sous lumière ultraviolette (5.3.8) et la récupérer à l'aide d'une microspatule (5.3.6). Éviter d'enlever les composants restés sur la ligne de départ.

Si la prise d'essai purifiée (8.3) était liquide à la température ambiante, recueillir la silice dans le ballon de méthylation de 25 ml (5.3.9) et procéder comme décrit en 8.6.

Si la prise d'essai purifiée (8.3) était solide à la température ambiante, recueillir la silice dans une fiole conique de 50 ml (5.3.11) avec 15 ml d'oxyde diéthylique. Agiter vigoureusement et filtrer la totalité de la silice dans un filtre en verre fritté (5.3.12). 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 ml à 5 ml, le transférer dans le ballon de méthylation de 25 ml (5.3.9) 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 (8.3) doit être recommencée ou l'activité de la lipase recontrôlée (voir annexe A).

8.6 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 Fidélité

10.1 Essais interlaboratoires

Les détails relatifs à un essai interlaboratoires portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe B. Les valeurs dérivées de ces essais peuvent ne pas être applicables à d'autres plages et matrices de concentration que celles données.

10.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne doit pas être supérieure à:

0,2 % (*m/m*) pour des teneurs en constituant < 5 % (*m/m*);

1 % (*m/m*) ou 3 % de la moyenne de deux résultats pour des teneurs en constituant \geq 5 % (*m/m*).

10.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents, par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, ne doit pas être supérieure à:

0,5 % (*m/m*) pour des teneurs en constituants < 5 % (*m/m*);

3 % (*m/m*) ou 10 % de la moyenne de deux résultats pour des teneurs en constituant \geq 5 % (*m/m*).

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer:

- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue,
- la méthode utilisée,
- le(s) résultat(s) d'essai obtenu(s), et
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

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 d'essai.

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