

---

---

**Corps gras d'origines animale  
et végétale — Chromatographie en phase  
gazeuse des esters méthyliques d'acides  
gras —**

Partie 2:

**Préparation des esters méthyliques  
d'acides gras**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid  
methyl esters —*

*ISO 12966-2:2011*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8039b895b645/iso-12966-2-2011>  
*Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids*



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

ISO 12966-2:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>



### DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2011

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 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

**Sommaire**

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction.....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Réactions</b> .....	1
4 <b>Méthodologie</b> .....	2
4.1 <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	2
4.2 <b>Méthode rapide</b> .....	2
4.3 <b>Méthode générale</b> .....	4
4.4 <b>Transméthylation à l'aide d'un catalyseur au trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>)</b> .....	6
4.5 <b>Transméthylation par catalyse acide des glycérides</b> .....	10
<b>Annexe A (informative) Méthode de chromatographie sur couche mince pour vérifier l'état complet de la dérivation</b> .....	12
<b>Bibliographie</b> .....	16

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

ISO 12966-2:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>

## 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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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 du présent document 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.

L'ISO 12966-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*. (standards.iteh.ai)

Cette première édition de l'ISO 12966-2 annule et remplace l'ISO 5509:2000, dont elle constitue une révision technique.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>

L'ISO 12966 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Corps gras d'origines animale et végétale — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras*:

- *Partie 2: Préparation des esters méthyliques d'acides gras*
- *Partie 3: Préparation des esters méthyliques à l'aide d'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH)*

La partie suivante est en cours d'élaboration:

- *Partie 4: Détermination des acides gras saturés, mono- et poly-insaturés, cis ou trans, dans les corps gras d'origines végétale ou animale (non ruminant)*

La partie suivante est prévue:

- *Partie 1: Lignes directrices pour la chromatographie en phase gazeuse*

## Introduction

### Généralités

Les corps gras (c'est-à-dire les lipides liquides et solides) sont essentiellement composés d'esters d'acides gras de glycérol (triacylglycérols, ou TAG), avec des quantités moindres d'esters d'acides gras de stérols et d'alcools aliphatiques à longue chaîne. Du fait de leur masse moléculaire élevée et leur très faible volatilité, les TAG sont difficiles à analyser directement par chromatographie en phase gazeuse (CG), en particulier si une analyse détaillée des acides gras insaturés est requise. Les acides gras eux-mêmes ne réagissent pas bien à la chromatographie (à l'exception des acides gras à chaîne courte tels que les acides butyrique et valérique). La pratique recommandée consiste donc à former des esters d'acides gras, généralement des esters méthyliques d'acides gras (EMAG), avant la CG.

L'analyse des corps gras a été étudiée de manière approfondie dans la Référence [9].

La formation d'EMAG constitue une phase essentielle de l'analyse des acides gras. La conversion non quantitative des acides gras en EMAG, la modification de la structure des acides gras (par exemple les changements dans les isomères géométriques et de position présents) et la formation d'artéfacts non-EMAG peuvent toutes affecter la détermination quantitative de la composition en acides gras.

La transestérification est l'un des mécanismes qui peuvent être employés pour former des EMAG à partir des esters d'acides gras présents dans des corps gras (triacylglycérol, par exemple). Des méthodes de transestérification par catalyse alcaline ou acide peuvent être utilisées pour former des EMAG dans un milieu méthanolique — cette méthode porte le nom de *transméthylation*. La transméthylation est un processus réversible et de grandes quantités de méthanol sont nécessaires pour maintenir un état d'équilibre favorisant la formation d'EMAG. La présence d'eau peut empêcher la réaction d'aller à son terme, et il convient donc de la réduire au minimum. Les méthodes par catalyse alcaline ne produisent pas d'EMAG à partir d'acides gras, en raison de la formation de savons.

L'estérification est un mécanisme à catalyse acide qu'il est possible d'employer pour former des EMAG à partir d'acides gras. Les acides gras peuvent être naturellement présents dans l'échantillon de corps gras analysé. La formation d'EMAG à l'aide de ce mécanisme est communément appelée *méthylation*. À nouveau, une grande quantité de méthanol et l'absence d'eau sont des conditions préalables à la formation quantitative d'EMAG.

La présente partie de l'ISO 12966 fournit des lignes directrices pour la préparation d'esters méthyliques d'acides gras. Diverses méthodes de préparation d'esters méthyliques d'acides gras sont spécifiées en complément de ces lignes directrices. Celles-ci comprennent:

- a) la transméthylation «rapide» en conditions alcalines;
- b) la transméthylation/méthylation «générale» en conditions alcalines et acides séquentielles;
- c) la transméthylation/méthylation au trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>).

### Transméthylation «rapide» en conditions de catalyse alcalines

Cette méthode s'applique à l'analyse de routine des matières grasses alimentaires contenant des acides gras à partir de l'acide butyrique (C4:0) et/ou pour la détermination de l'acide butyrique ou de l'acide hexanoïque (C6:0) par CG à l'aide d'un étalon interne.

Les catalyseurs alcalins transestérifient les lipides neutres en présence de méthanol anhydre (transméthylation) plus rapidement que les catalyseurs acides. Les inconvénients liés à ces méthodes par catalyse alcaline tiennent au fait que les acides gras libres ne sont pas estérifiés et que la présence d'eau peut empêcher la transméthylation d'aller jusqu'à son terme (hydrolyse des EMAG en acides gras libres). Les réactifs les plus couramment utilisés sont l'hydroxyde de potassium et de sodium, ainsi que le méthoxyde de sodium en présence de méthanol anhydre.

### Transméthylation/méthylation «générale» en conditions alcalines et acides séquentielles

Cette méthode en conditions de catalyse alcaline et acide séquentielles est applicable à tous les corps gras, y compris les huiles distillées et acides, mais n'est pas recommandée pour les huiles lauriques. Les esters méthyliques d'acides gras à chaîne courte sont facilement perdus lors du reflux. Pour les huiles lauriques, la méthode de transméthylation «rapide» est recommandée.

Au cours de la méthylation, les substances contenant les configurations suivantes peuvent être totalement ou partiellement décomposées:

- a) les groupes cétone, époxy, hydroxyle, hydroperoxy;
- b) les groupes cyclopropyle et cyclopropényle;
- c) les acides gras acétyléniques.

### Transméthylation/méthylation au trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>)

En raison de la toxicité du BF<sub>3</sub>, il est recommandé de n'utiliser cette méthode qu'en dernier recours.

La méthode au BF<sub>3</sub> est applicable à la plupart des huiles, graisses et substances dérivées (acides gras, savons) à l'exception des matières grasses laitières et des graisses contenant des acides gras de types spécifiques.

ISO 12966-2:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-80398950649/ISO-12966-2-2011>

Au cours de la méthylation, les substances contenant les configurations suivantes peuvent être totalement ou partiellement décomposées:

- a) les groupes cétone, époxy, hydroxyle, hydroperoxy;
- b) les groupes cyclopropyle et cyclopropényle;
- c) les acides gras acétyléniques.

La méthode peut s'appliquer si la matière grasse contient des substances de ce type en très petites quantités seulement (huile de coton, par exemple); sinon, il convient de suivre la méthode de transméthylation/méthylation «rapide» ou «générale».

Pour la CG, la récupération optimale des esters méthyliques du mélange réactionnel est obtenue en utilisant de l'isooctane (2,2,4-triméthylpentane). Cependant, seulement 75 % environ du caproate de méthyle présent sont récupérés.

Le trifluorure de bore est un acide de Lewis fort et, sous la forme de son complexe de coordination avec le méthanol, il peut méthyler rapidement les acides gras en conditions de reflux. Le trifluorure de bore méthanolique transméthyle bien les esters d'acides gras (triglycéride, par exemple), mais la vitesse de réaction est plus lente que la méthylation des acides gras. Une solution méthanolique de trifluorure de bore est disponible dans le commerce, ce qui renforce l'attrait de ce catalyseur acide, mais son utilisation présente des inconvénients potentiels.

- a) Il a été signalé que de fortes concentrations de trifluorure de bore (50 % fraction massique) produisent des artéfacts méthoxy à partir d'acides gras insaturés.
- b) Le réactif a une durée de conservation limitée à température ambiante et il convient de le conserver au frais.

- c) Un réactif vieilli peut produire des artefacts, c'est pourquoi il est recommandé d'essayer chaque nouveau lot acheté avant utilisation, ainsi que périodiquement sur la durée de vie.
- d) Le trifluorure de bore méthanolique est un réactif acide et peut donc produire des dérivés d'acides gras contenant des groupes labiles pouvant entraîner l'apparition de pics parasites sur les chromatogrammes d'EMAG.

### Informations complémentaires

Une attention particulière a été portée à la préparation et l'analyse des esters d'acides gras à chaîne courte par CG, en grande partie en raison de leur occurrence dans les matières grasses laitières. Les acides gras à chaîne courte, à l'état libre ou estérifié en glycérol, peuvent être convertis complètement en esters méthyliques par n'importe lequel des réactifs décrits dans les alinéas précédents, mais la récupération quantitative à partir du milieu réactionnel ne peut être réalisée sans prendre de précautions spéciales. Des pertes peuvent se produire à plusieurs stades dans toute méthode. Les esters d'acides gras à chaîne courte (méthyle notamment) sont volatils et peuvent subir des pertes sélectives lors du reflux du milieu d'estérification; ils sont plus solubles dans l'eau que les esters à plus longue chaîne et peuvent être perdus lors d'une phase d'extraction aqueuse; ou ils peuvent être éliminés par distillation lors de l'évaporation du solvant d'extraction. Des pertes sélectives peuvent également se produire lorsque des impuretés non saponifiables doivent être éliminées par sublimation ou purification par chromatographie sur couche mince (CCM). Les meilleures méthodes d'estérification pour les acides gras à chaîne courte sont celles où le chauffage des réactifs est évité et où les phases d'extraction aqueuse ou d'élimination de solvant sont absentes.

L'injection de milieux réactionnels contenant des catalyseurs d'estérification basiques et acides directement sur les colonnes de CG réduit leur durée de vie. Les quelques centimètres supérieurs des colonnes remplies peuvent être regarnis périodiquement, tandis que l'utilisation de longueurs de tubes désactivés ou «précolonnes de rétention» à l'avant des colonnes capillaires les protège. Il s'agit là de bien peu de choses pour assurer vitesse, simplicité et précision de ces méthodes.

En outre, la présente partie de l'ISO 12966 décrit une méthode simple de CCM pour vérifier l'efficacité de la transméthylation/méthylation. Cette méthode peut également être utilisée pour vérifier la composition générique d'un corps gras avant d'entreprendre la transméthylation/méthylation.

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

ISO 12966-2:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>



# Corps gras d'origines animale et végétale — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras —

## Partie 2: Préparation des esters méthyliques d'acides gras

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 12966 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 de corps gras d'origines animale et végétale, d'acides gras et de savons. Afin de répondre à différentes exigences, quatre méthodes de méthylation sont spécifiées, à savoir:

- une méthode de transméthylation «rapide» en conditions alcalines;
- une méthode de transméthylation/méthylation «générale» en conditions alcalines et acides séquentielles;
- une méthode de transméthylation au  $\text{BF}_3$ ;
- une méthode alternative reposant sur la transméthylation par catalyse acide de glycérides.

Les esters méthyliques ainsi obtenus sont utilisés dans diverses méthodes d'analyse exigeant des produits dérivés de ce type, par exemple la chromatographie gaz-liquide (CGL), la chromatographie sur couche mince (CCM) et la spectrométrie infrarouge (IR).

### 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application de la présente norme. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence (y compris les éventuels amendements) s'applique.

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

### 3 Réactions

La détermination de la composition en acides gras des huiles et des graisses est l'une des analyses fondamentales dans le secteur des corps gras et a été étudiée de manière approfondie dans la Référence [9]. À cette fin, les composants acides gras des lipides sont généralement convertis en esters méthyliques avant analyse par CG.

La méthode «rapide» (4.2) ne dérive pas les acides gras libres (AGL) présents dans l'huile en esters méthyliques d'acides gras (EMAG). Si des AGL sont présents, il est généralement supposé que ces AGL ont la même distribution d'acides gras que les triglycérides. Cela est généralement vrai pour les huiles brutes, mais moins pour les huiles fractionnées ou raffinées. À l'exception de certaines huiles de pression à froid, la règle générale est que les huiles avec moins de 0,5 % (fraction massique) d'AGL ont probablement été

raffinées; les huiles se situant au-delà peuvent être considérées comme étant brutes. La concentration acceptable d'AGL dans l'huile dépend de l'huile particulière analysée, ainsi que de l'utilisation prévue des données EMAG générées. La présence d'AGL dans l'huile peut introduire des pics supplémentaires sur le chromatogramme final et rendre problématique l'identification des EMAG synthétisés à l'aide de la méthode de transméthylation «rapide».

La méthode «générale» (4.3) dérive à la fois les AGL et les esters glycériques en EMAG (voir 4.3.1).

Il revient à l'analyste de décider s'il est préférable d'utiliser la méthode «rapide» ou «générale» selon la nature de l'huile analysée. Il n'en demeure pas moins, en règle générale, que l'utilisation de la méthode «rapide» est envisagée uniquement si la teneur en AGL est inférieure ou égale à 0,5 % (fraction massique). La méthode «générale» (4.3) est conseillée pour les huiles dont la teneur en AGL est supérieure à 0,5 % (fraction massique). En alternative, la méthode de transméthylation par catalyse spécifiée en 4.5 peut être utilisée si un corps gras partiellement hydrolysé doit être converti en EMAG.

En raison de la toxicité du  $\text{BF}_3$ , il est recommandé de n'utiliser la méthode au  $\text{BF}_3$  (4.4) qu'en dernier recours.

## 4 Méthodologie

**AVERTISSEMENT** — La méthode spécifiée implique l'utilisation de réactifs potentiellement dangereux. Des précautions d'usage doivent être prises pour la protection des yeux et contre les risques de brûlures chimiques corrosives. La solution méthanolique d'hydroxyde de potassium est toxique.

### 4.1 Préparation de l'échantillon pour essai

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

### 4.2 Méthode rapide

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8400e288-91f7-40a7-98b3-8039b895b645/iso-12966-2-2011>

#### 4.2.1 Applicabilité

La méthode de transméthylation rapide en conditions de catalyse alcalines peut s'employer pour l'analyse de routine des matières grasses alimentaires contenant des acides gras à partir de l'acide butyrique (C4:0) et/ou pour la détermination de l'acide butyrique ou de l'acide hexanoïque (C6:0) par CG à l'aide d'un étalon interne.

NOTE 1 Cette méthode ne dérive pas les AGL en EMAG. L'analyste doit noter que la présence d'AGL dans la solution finale pourrait affecter la qualité de la chromatographie en phase gazeuse qui s'ensuit.

NOTE 2 Selon le COI/T.20/Doc. N° 24:2001<sup>[8]</sup>, une méthode similaire peut être appliquée directement sur des échantillons des catégories d'huile suivantes:

- huile d'olive vierge avec une acidité inférieure à 3,3 %;
- huile d'olive raffinée;
- huile d'olive (mélange d'huile d'olive vierge et raffinée);
- huile de grignons d'olive raffinée;
- huile de grignons d'olive (mélange d'huile d'olive vierge et d'huile de grignons d'olive raffinée).

#### 4.2.2 Principe

Les esters méthyliques sont formés par transméthylation avec de l'hydroxyde de potassium méthanolique. Les acides gras libres ne sont pas estérifiés par cette méthode.

### 4.2.3 Réactifs

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

Les réactifs ne doivent pas produire de pics qui interfèrent avec ceux des esters méthyliques d'acides gras pendant la CG. Il convient de vérifier tout nouveau lot de réactif ou de solvant en l'utilisant pour préparer l'ester méthylique de l'acide oléique pur. Si des pics supplémentaires apparaissent de façon intempestive au cours de l'analyse CG finale, il convient de rejeter le réactif concerné.

**4.2.3.1 Méthanol**, ne contenant pas plus de 0,5 % d'eau (fraction massique).

**4.2.3.2 Eau**, conforme à la qualité 3 de l'ISO 3696<sup>[3]</sup>.

**4.2.3.3 Hydrogénosulfate de sodium**, anhydre.

**4.2.3.4 Isooctane (2,2,4-triméthylpentane)**, de qualité chromatographique.

**AVERTISSEMENT** — L'isooctane est un liquide inflammable qui présente des risques d'incendie. Les limites d'explosivité dans l'air sont de 1,1 % à 6,0 % (fraction volumique). Il est toxique par ingestion et inhalation. Utiliser une hotte ventilée en bon état de marche pour travailler avec ce solvant.

**4.2.3.5 Hydroxyde de potassium** en solution méthanolique, concentration en quantité de matière  $c \approx 2$  mol/l.

Dissoudre en réchauffant lentement 13,1 g d'hydroxyde de potassium (fraction massique  $w = 85$  g/100 g) dans 100 ml de méthanol absolu.

**4.2.3.6 Solution mère d'étalon interne**, pour la détermination de l'acide butyrique et/ou hexanoïque uniquement.

Peser 250 mg (à 0,1 mg près) d'ester méthylique de l'acide valérique (pentanoate de méthyle) dans une fiole jaugée de 50 ml (4.2.4.4). Utiliser de l'isooctane pour dissoudre l'échantillon et compléter jusqu'au trait avec le même solvant.

**4.2.3.7 Solution de référence d'étalon interne**, pour la détermination de l'acide butyrique et/ou hexanoïque uniquement.

Introduire (4.2.4.2) 10 ml de solution mère dans une fiole jaugée de 100 ml (4.2.4.4) et compléter jusqu'au trait avec de l'isooctane. Calculer la concentration de cette solution de référence.

**4.2.3.8 Solution de chlorure de sodium**. Dissoudre 40 g de chlorure de sodium dans 100 ml d'eau.

### 4.2.4 Appareillage

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

**4.2.4.1 Tubes à essai à bouchon à vis**, 10 ml, avec bouchon muni d'un joint en polytétrafluoréthylène (PTFE).

**4.2.4.2 Pipettes**, de capacité 0,1 ml, 2 ml et 10 ml, ISO 8655-2<sup>[6]</sup>.

**4.2.4.3 Flacons à échantillon en verre**, 3 ml.

**4.2.4.4 Fioles jaugées à un trait**, de capacité 50 ml et 100 ml, ISO 1042<sup>[2]</sup> classe A.