

---

---

**Corps gras d'origine végétale —  
Détermination des équivalents au beurre  
de cacao dans le chocolat au lait**

*Vegetable fats and oils — Determination of cocoa butter equivalents in  
milk chocolate*

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

[ISO 11053:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b6213d7-6566-44f2-8300-aa1ea6ec8753/iso-11053-2009)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b6213d7-6566-44f2-8300-  
aa1ea6ec8753/iso-11053-2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b6213d7-6566-44f2-8300-aa1ea6ec8753/iso-11053-2009)



**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 11053:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b6213d7-6566-44f2-8300-aa1ea6ec8753/iso-11053-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b6213d7-6566-44f2-8300-aa1ea6ec8753/iso-11053-2009>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2009

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 |
| 1 <b>Domaine d'application</b> .....   | 1  |
| 2 <b>Termes et définitions</b> .....   | 1  |
| 3 <b>Principe</b> .....  | 1  |
| 4 <b>Réactifs, solutions et étalons</b> .....  | 2  |
| 5 <b>Appareillage et équipement</b> .....  | 3  |
| 6 <b>Échantillonnage</b> .....   | 5  |
| 7 <b>Préparation de l'échantillon</b> .....  | 5  |
| 7.1 <b>Préparation de l'IRMM-801 pour les besoins d'étalonnage et les essais d'aptitude du système</b> ..... | 5  |
| 7.2 <b>Préparation de la matière grasse pure du lait pour les essais d'aptitude du système</b> .....         | 5  |
| 7.3 <b>Préparation de l'échantillon de chocolat</b> .....  | 5  |
| 8 <b>Mode opératoire</b> .....   | 6  |
| 8.1 <b>Construction de la courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en PSB</b> .....            | 6  |
| 8.2 <b>Séparation des TAG individuels de l'IRMM-801 par CGL-HR</b> .....                                     | 7  |
| 8.3 <b>Séparation des TAG individuels de MGL pure par CGL-HR</b> .....                                       | 8  |
| 8.4 <b>Séparation des TAG individuels de la matière grasse du chocolat par CGL-HR</b> .....                  | 8  |
| 8.5 <b>Identification</b> .....  | 8  |
| 9 <b>Calcul</b> .....  | 9  |
| 9.1 <b>Quantification de PSB et MGL dans la matière grasse du chocolat et le chocolat</b> .....              | 9  |
| 9.2 <b>Détection d'EBC dans la matière grasse du chocolat</b> .....  | 10 |
| 9.3 <b>Quantification des EBC dans la matière grasse du chocolat et dans le chocolat</b> .....               | 12 |
| 10 <b>Exigences de la méthode</b> .....  | 14 |
| 10.1 <b>Considérations générales</b> .....   | 14 |
| 10.2 <b>Aptitude à l'emploi du système</b> .....   | 14 |
| 11 <b>Fidélité</b> .....   | 15 |
| 11.1 <b>Essai interlaboratoires</b> .....  | 15 |
| 11.2 <b>Répétabilité</b> .....   | 15 |
| 11.3 <b>Reproductibilité</b> .....   | 15 |
| 12 <b>Rapport d'essai</b> .....  | 15 |
| <b>Annexe A (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires</b> .....                                   | 16 |
| <b>Annexe B (informative) Exemple de chromatogrammes</b> .....   | 20 |
| <b>Bibliographie</b> .....   | 23 |

## 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 11053 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)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b6213d7-6566-44f2-8300-aa1ea6ec8753/iso-11053-2009>

# Corps gras d'origine végétale — Détermination des équivalents au beurre de cacao dans le chocolat au lait

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détection et de quantification des équivalents au beurre de cacao (EBC) et matière grasse du lait (MGL) dans le chocolat au lait par établissement de profils de triacylglycérols (TAG) en utilisant la chromatographie gaz-liquide sur colonne capillaire haute résolution (CGL-HR) ainsi que les évaluations subséquentes des données par analyse de régression simple ou partielle des moindres carrés. Les adjuvants d'EBC peuvent être détectés à un niveau minimal de 0,5 g d'EBC/100 g de chocolat au lait et évalués quantitativement à un niveau d'ajout de 5 % en fraction massique d'EBC au chocolat au lait, avec une erreur prévue de 0,7 g d'EBC/100 g de chocolat au lait.

## 2 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

### 2.1

#### teneur en matière grasse du lait dans le chocolat au lait

fraction massique de matière grasse du lait dans le chocolat au lait, déterminée par la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

NOTE La fraction massique est exprimée en grammes par 100 g de chocolat au lait.

### 2.2

#### équivalents au beurre de cacao

##### EBC

corps gras d'origine végétale, autres que le cacao, détectés dans le chocolat au lait conformément à la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

NOTE Le résultat est exprimé en terme qualitatif, c'est-à-dire EBC présents/EBC absents (OUI/NON).

### 2.3

#### teneur en équivalents au beurre de cacao du chocolat au lait

fraction massique des substances déterminée par la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

NOTE La fraction massique est exprimée en grammes par 100 g de chocolat au lait.

## 3 Principe

Les échantillons pour essai, c'est-à-dire la matière grasse du chocolat obtenue à partir du chocolat au lait en utilisant une méthode d'extraction rapide de matière grasse, sont séparés par CGL-HR en fractions de TAG selon leur masse moléculaire et leur degré d'insaturation. Les fractions individuelles de TAG, c'est-à-dire 1-palmityl-2-stéaryl-3-butyrylglycérol (PSB), 1,3-dipalmityl-2-oléylglycérol (POP), 1-palmityl-2-oléyl-3-stéarylglycérol (POS), 1-palmityl-2,3-dioléylglycérol (POO), 1,3-distéaryl-2-oléylglycérol (SOS) et 1-stéaryl-2,3-dioléylglycérol (SOO), sont utilisées:

- a) pour calculer la teneur en MGL dans la matière grasse du chocolat (grammes de MGL par 100 g de matière grasse du chocolat);
- b) pour déterminer la présence/l'absence d'EBC dans la matière grasse du chocolat en utilisant un modèle de régression linéaire simple fondé sur les trois TAG: POP, POS et SOS corrigées pour la contribution du TAG provenant de la MGL, et si cette méthode indique que l'échantillon n'est pas du beurre de cacao pur (BC);
- c) pour quantifier la quantité d'adjuvant d'EBC dans la matière grasse du chocolat (grammes d'EBC par 100 g de matière grasse du chocolat) en utilisant un modèle de régression partielle des moindres carrés à six variables d'entrée, c'est-à-dire les cinq TAG: POP, POS, POO, SOS et SOO normalisés à 100 % et la teneur en MGL déterminée de la matière grasse du chocolat.

Afin de garantir l'étiquetage correct du chocolat au lait, les résultats obtenus pour la matière grasse du chocolat sont convertis en grammes de MGL par 100 g de chocolat et grammes d'EBC par 100 g de chocolat, ce qui nécessite la détermination exacte de la teneur totale en matière grasse du chocolat en utilisant une méthode d'extraction de Soxhlet (fondée sur la méthode officielle 963.15 de l'AOAC [5]). Lorsque la méthode de détection montre l'absence d'EBC dans la matière grasse du chocolat, la quantification et la teneur totale en matière grasse ne sont pas nécessaires.

## 4 Réactifs, solutions et étalons

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

**AVERTISSEMENT** — L'attention est attirée sur les réglementations traitant de la manipulation des substances dangereuses. Il convient de suivre les mesures de sécurité d'ordre technique, organisationnel et personnel.

**4.1 Matériau de Référence Certifié du beurre de cacao (IRMM-801)<sup>1)</sup>** (voir Référence [6]), pour les besoins d'étalonnage et les essais d'aptitude du système.

**4.2 Matière grasse du lait pure**, pour les essais d'aptitude du système.

**4.3 1-palmityl-2-stéaryl-3-butyrylglycérol (PSB)<sup>2)</sup>**.

### 4.3.1 Généralités

Pour les besoins d'étalonnage, dissoudre environ 40 mg de PSB dans une fiole jaugée de 50 ml (5.9) avec de l'isooctane pour obtenir une solution mère d'environ  $\rho = 0,8$  mg/ml. Mélanger soigneusement jusqu'à dissolution complète.

À partir de cette solution mère de PSB, préparer une série de cinq solutions étalons dans la matrice (IRMM-801) en pesant, sur une balance analytique (5.1) l'IRMM-801 (4.1) dans des fioles jaugées de 25 ml (5.9) et en ajoutant les volumes respectifs de la solution mère de PSB comme indiqué dans le Tableau 1. Compléter jusqu'au repère avec de l'isooctane.

---

1) Disponible auprès de l'Institut des matériaux de référence et des mesures (<http://irmm.jrc.ec.europa.eu/>), Belgique. 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 de ce produit.

2) Disponible auprès de Larodan (<http://www.larodan.se/>), Suède. 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 du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Tableau 1 — Masses d'IRMM-801 et volumes de solution mère de PSB pour la préparation de la série des solutions étalons de PSB dans la matrice

| Solution étalon | IRMM-801 (4.1) pesé dans une fiole jaugée de 25 ml<br>mg | Volume prélevé de solution mère de PSB et ajouté dans la fiole jaugée de 25 ml<br>ml | Concentration de PSB dans la solution étalon<br>$\rho_{\text{PSB}}^i$<br>mg/ml | Concentration finale en IRMM-PSB dans la solution<br>$\rho_{\text{IRMM-PSB}}$<br>mg/ml |
|-----------------|--|--|--|--|
| 1               | ~250   | 4  | 0,128  | ~10  |
| 2               | ~250   | 3  | 0,096  | ~10  |
| 3               | ~250   | 2  | 0,064  | ~10  |
| 4               | ~250   | 1  | 0,032  | ~10  |
| 5               | ~250   | 0,5  | 0,016  | ~10  |

#### 4.3.2 Injection en tête de colonne à froid (ITCF)

Diluer chaque solution étalon à  $\varphi = 1 \text{ ml}/5 \text{ ml}$  avec de l'isooctane pour obtenir une concentration finale en IRMM-PSB ( $\rho_{\text{IRMM-PSB}}$ ) d'environ 2 mg/ml dans chaque solution et des concentrations en PSB ( $\rho_{\text{PSB}}$ ) allant de 0,025 6 mg/ml (solution étalon 1) à 0,003 2 mg/ml (solution étalon 5).

#### 4.3.3 Injection avec division (par exemple rapport de division de 1:10)

Diluer chaque solution étalon à  $\varphi = 1 \text{ ml}/2 \text{ ml}$  avec de l'isooctane pour obtenir une concentration finale en IRMM-PSB ( $\rho_{\text{IRMM-PSB}}$ ) d'environ 5 mg/ml dans chaque solution et des concentrations en PSB ( $\rho_{\text{PSB}}$ ) allant de 0,064 mg/ml (solution étalon 1) à 0,008 mg/ml (solution étalon 5).

NOTE Les concentrations finales en PSB doivent être calculées en utilisant la masse réelle dans la solution étalon mère.

#### 4.4 $\alpha$ -Cholestane<sup>3)</sup>, $\rho = 100 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ , utilisé comme étalon interne.

Dissoudre environ 50 mg d' $\alpha$ -cholestane dans 50 ml d'isooctane.

— Pour l'injection en tête de colonne à froid: Diluer à 1:250 ( $\rho = 0,004 \text{ mg}/\text{ml}$ ).

— Pour l'injection avec division (par exemple rapport de division de 1:10): Diluer à 1:100 ( $\rho = 0,01 \text{ mg}/\text{ml}$ ).

**4.5 Solvant de matière grasse**, solvants non chlorés (par exemple éther de pétrole, *n*-hexane, *n*-heptane, isooctane).

**4.6 Acide chlorhydrique**,  $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol}/\text{l}$ .

## 5 Appareillage et équipement

**5.1 Balance analytique**, lisible à 0,1 mg près.

**5.2 Étuve**. Un bloc de séchage à sec peut être utilisé.

3) Disponible auprès de Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/>), Belgique.

- 5.3 Papier-filtre**, de 15 cm de diamètre [par exemple S&S 589/1<sup>4</sup>].
- 5.4 Râpe à aliments**, mélangeur de cuisine avec une conception comportant le moteur au-dessus de la chambre de mélange pour éviter la fusion des échantillons.
- 5.5 Évaporateur rotatif**. D'autres méthodes d'évaporation peuvent être utilisées.
- 5.6 Bloc d'évaporation**, avec alimentation en azote.
- 5.7 Dessiccateur**, enceinte hermétique contenant des déshydratants, utilisée pour conserver les produits sensibles à l'humidité.
- 5.8 Extracteur de Soxhlet**, avec raccords coniques normalisés, capacité de siphon d'environ 100 ml (cartouche pour extraction 33 mm × 88 mm), erlenmeyer de 250 ml et chauffe-ballon réglé (ou équivalent).
- 5.9 Fioles jaugées**, d'une capacité de 10 ml, 25 ml, 50 ml et 100 ml (ou autres capacités si nécessaire), ISO 1042 <sup>[2]</sup>, classe A.
- 5.10 Pipettes**, de capacités allant de 1 ml à 10 ml (ou autres capacités si nécessaire), ISO 648<sup>[1]</sup>, classe A ou ISO 8655-2<sup>[4]</sup>.
- 5.11 Microseringue**, d'un volume maximal de 10 µl, graduée à 0,1 µl, ou injecteur automatique d'échantillon.
- 5.12 Chromatographe en phase gazeuse (CG)**, équipé d'un injecteur en tête de colonne à froid ou d'un système d'injection avec division et d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF).

NOTE 1 D'autres systèmes d'injection [par exemple un vaporisateur à température programmée (PTV) ou un injecteur à aiguille mobile] peuvent être utilisés à condition d'obtenir les mêmes résultats que ceux indiqués en 10.2.

La séparation et la quantification s'avèrent satisfaisantes si les conditions expérimentales suivantes sont suivies:

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b6213d7-6566-44f2-8300-1a1111111111/iso-11053-2009>

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Colonne de CGL:                  | BC-TAP 25 m × 0,25 mm de diamètre intérieur, silice fondue enduite d'une phase stationnaire thermostable moyennement polaire de type phénylméthylpolysiloxane, d'épaisseur de film 0,10 µm |
| Programme d'étuve pour ITCF:     | 100 °C maintenus pendant au minimum 2 min; 30 °C/min jusqu'à 270 °C maintenus pendant 1 min; 2,5 °C/min jusqu'à 340 °C maintenus pendant 7 min   |
| Programme d'étuve pour diviseur: | 200 °C maintenus pendant au minimum 1 min; 14 °C/min jusqu'à 270 °C maintenus pendant 1 min; 2,5 °C/min jusqu'à 340 °C maintenus pendant 10 min  |
| Détecteur (DIF):                 | 360 °C   |
| Gaz vecteur pour ITCF:           | H <sub>2</sub> (pureté ≥ 99,999 %) avec un débit constant de 3,5 ml/min (l'hélium peut également être un gaz vecteur convenable)   |
| Gaz vecteur pour diviseur:       | H <sub>2</sub> (pureté ≥ 99,999 %) avec un débit constant de 2,5 ml/min (l'hélium peut également être un gaz vecteur convenable)   |

NOTE 2 Les colonnes et d'autres conditions expérimentales, utilisées dans une étude interlaboratoires internationale (voir Référence [7]), sont énumérées dans le Tableau A.1. Les conditions de fonctionnement peuvent être modifiées pour obtenir une séparation optimale.

### 5.13 Système de données chromatographiques.

4) Le papier ruban noir S&S 589/1 est un exemple de produit approprié disponible 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 du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.



## 6 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 5555 [3]. Il convient d'envoyer au laboratoire un échantillon représentatif. Il convient qu'il ne soit pas endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

## 7 Préparation de l'échantillon

### 7.1 Préparation de l'IRMM-801 pour les besoins d'étalonnage et les essais d'aptitude du système

Avant l'ouverture et l'utilisation de l'IRMM-801 (4.1), chauffer l'ampoule dans une étuve (5.2) jusqu'à fusion du contenu. Après obtention d'une solution claire, mélanger le contenu par inversions répétées pendant au moins 20 s. Ouvrir et transférer ensuite le contenu dans une fiole propre, qui peut être hermétiquement scellée et conservée dans un endroit frais pour utilisation ultérieure.

### 7.2 Préparation de la matière grasse pure du lait pour les essais d'aptitude du système

Si aucune MGL pure n'est disponible, elle peut être obtenue à partir d'un échantillon de beurre par fusion et passage de la couche de matière grasse sur un papier-filtre plissé (5.3) dans une étuve (5.2) à 50 °C.

### 7.3 Préparation de l'échantillon de chocolat

#### 7.3.1 Généralités

Refroidir environ 200 g de chocolat jusqu'à durcissement, et le râper jusqu'à l'état granulaire fin à l'aide d'une râpe à aliments (5.4). Mélanger soigneusement et conserver dans une bouteille hermétiquement bouchée dans un endroit frais.

#### 7.3.2 Extraction rapide de matière grasse

La matière grasse du chocolat est extraite de 5 g de chocolat râpé (7.3.1) au moyen de deux à trois portions de 10 ml d'un solvant approprié à l'extraction des matières grasses (4.5). Centrifuger et décanter. Combiner les extraits, évaporer (5.5) la majeure partie du solvant, puis sécher sous azote (5.6).

La matière grasse du chocolat obtenue par l'extraction rapide de matière grasse est utilisée pour l'analyse finale de TAG par CGL-HR. Pour la détection des EBC dans le chocolat, la quantité précise de matière grasse totale dans le chocolat n'est pas nécessaire. Lorsque aucun EBC n'est détecté, la deuxième partie de la norme, c'est-à-dire la quantification des EBC autour de la limite établie de 5 %, n'est pas nécessaire. Lorsque des EBC sont détectés, il convient de réaliser la quantification en utilisant le même profil de TAG que celui utilisé pour la détection des EBC. Cependant, dans ce cas, déterminer la quantité précise de matière grasse totale dans le chocolat en utilisant la méthode en 7.3.3. D'autres méthodes d'extraction peuvent être utilisées à condition d'obtenir les mêmes résultats.

#### 7.3.3 Détermination de la teneur totale en matière grasse

Séparer la matière grasse du chocolat et déterminer la teneur totale en matière grasse dans un échantillon de chocolat au lait (préparé tel que décrit en 7.3.2) par extraction de Soxhlet (fondée sur la méthode officielle 963.15 de l'AOAC [5]), comme suit.

Peser (5.1) 4 g à 5 g de chocolat dans un bécher de 300 ml à 500 ml. Ajouter lentement, tout en remuant, 45 ml d'eau bouillante pour obtenir une suspension homogène. Ajouter 55 ml de HCl (4.6) et quelques régulateurs d'ébullition exempts de matière grasse, ou autres agents anti-projection, et remuer. Couvrir avec un verre de montre, porter la solution lentement à ébullition, et laisser bouillir doucement pendant 15 min. Rincer le verre de montre avec 100 ml d'eau. Filtrer la solution à l'aide d'un papier-filtre plissé moyen (5.3) ou

un équivalent, en rinçant le bécher trois fois avec de l'eau. Continuer le rinçage jusqu'à ce que la dernière portion du filtrat soit exempte de chlore. Transférer le filtre avec l'échantillon dans une cartouche pour extraction dégraissée et sécher pendant 2 h dans un petit bécher à 100 °C. Placer un bouchon de laine de verre sur le papier-filtre. Ajouter quelques agents anti-projections exempts de matière grasse dans un erlenmeyer de 250 ml et sécher pendant 1 h à 100 °C. Refroidir le flacon à la température ambiante dans un dessiccateur (5.7) et le peser (5.1). Placer la cartouche contenant l'échantillon séché dans l'extracteur de Soxhlet (5.8), en le soutenant avec une spirale ou des billes de verre. Rincer le bécher de digestion, le bécher de séchage et le verre de montre avec trois portions de 50 ml d'éther de pétrole, et ajouter les rinçages à la cartouche. Porter à ébullition à reflux l'échantillon digéré pendant 4 h, en ajustant la température pour que le siphonage de l'extracteur soit supérieur à 30 fois. Retirer le flacon et évaporer le solvant. Sécher le flacon à 102 °C à masse constante (1,5 h). Refroidir dans le dessiccateur (5.7) à température ambiante, puis peser (5.1). La masse constante est atteinte lorsque des périodes successives de séchage de 1 h indiquent une perte supplémentaire de matière grasse inférieure à 0,05 %. Il convient que les déterminations doubles s'inscrivent dans les limites de 0,1 % de matière grasse.

La fraction massique, exprimée sous forme de pourcentage, de matière grasse totale dans le chocolat,  $w_{\text{fat; choc}}$ , est donnée par:

$$w_{\text{fat; choc}} = \frac{m_{\text{fat}} \times 100}{m} \quad (1)$$

où

$m$  est la masse, en grammes, de chocolat prélevée;

$m_{\text{fat}}$  est la masse, en grammes, de la matière grasse totale obtenue à partir du chocolat par extraction de Soxhlet (fondée sur la méthode officielle 963.15 de l'AOAC [5]).

D'autres méthodes d'extraction peuvent être utilisées (par exemple par extraction accélérée de solvant, par dioxyde de carbone supercritique ou par micro-ondes) à condition d'obtenir les mêmes résultats. Il convient de ne pas utiliser la matière grasse du chocolat obtenue par l'extraction de Soxhlet pour l'analyse de TAG par CGL-HR, car il est possible d'observer dans certains cas des changements du profil de TAG obtenu.

Exprimer les résultats à deux décimales.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Construction de la courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en PSB

Cinq solutions étalons contenant des concentrations différentes de PSB (4.3) mais à concentration constante d' $\alpha$ -cholestane (4.4) sont préparées comme suit.

**Pour l'injection en tête de colonne à froid (ITCF):**

- **Solution étalon 1** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 1} = 0,012\ 8$  mg/ml;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 1} = 0,002$  mg/ml): Transférer 1 ml de la solution étalon 1 ( $\rho_{\text{PSB } 1} = 0,025\ 6$  mg/ml; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,004$  mg/ml; 4.4).
- **Solution étalon 2** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 2} = 0,009\ 6$  mg/ml;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 2} = 0,002$  mg/ml): Transférer 1 ml de la solution étalon 2 ( $\rho_{\text{PSB } 2} = 0,019\ 2$  mg/ml; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,004$  mg/ml; 4.4).
- **Solution étalon 3** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 3} = 0,006\ 4$  mg/ml;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 3} = 0,002$  mg/ml): Transférer 1 ml de la solution étalon 3 ( $\rho_{\text{PSB } 3} = 0,012\ 8$  mg/ml; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,004$  mg/ml; 4.4).

- **Solution étalon 4** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 4} = 0,0032 \text{ mg/ml}$ ;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 4} = 0,002 \text{ mg/ml}$ ): Transférer 1 ml de la solution étalon 4 ( $\rho_{\text{PSB } 4} = 0,0064 \text{ mg/ml}$ ; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,004 \text{ mg/ml}$ ; 4.4).
- **Solution étalon 5** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 5} = 0,0016 \text{ mg/ml}$ ;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 5} = 0,002 \text{ mg/ml}$ ): Transférer 1 ml de la solution étalon 5 ( $\rho_{\text{PSB } 5} = 0,0032 \text{ mg/ml}$ ; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,004 \text{ mg/ml}$ ; 4.4).

Injecter 0,5  $\mu\text{l}$  de chaque solution étalon dans le système de CGL-HR en utilisant le système d'injection en tête de colonne à froid.

#### Pour l'injection avec division:

- **Solution étalon 1** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 1} = 0,032 \text{ mg/ml}$ ;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 1} = 0,005 \text{ mg/ml}$ ): Transférer 1 ml de la solution étalon 1 ( $\rho_{\text{PSB } 1} = 0,064 \text{ mg/ml}$ ; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,01 \text{ mg/ml}$ ; 4.4).
- **Solution étalon 2** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 2} = 0,024 \text{ mg/ml}$ ;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 2} = 0,005 \text{ mg/ml}$ ): Transférer 1 ml de la solution étalon 2 ( $\rho_{\text{PSB } 2} = 0,048 \text{ mg/ml}$ ; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,01 \text{ mg/ml}$ ; 4.4).
- **Solution étalon 3** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 3} = 0,016 \text{ mg/ml}$ ;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 3} = 0,005 \text{ mg/ml}$ ): Transférer 1 ml de la solution étalon 3 ( $\rho_{\text{PSB } 3} = 0,032 \text{ mg/ml}$ ; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,01 \text{ mg/ml}$ ; 4.4).
- **Solution étalon 4** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 4} = 0,008 \text{ mg/ml}$ ;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 4} = 0,005 \text{ mg/ml}$ ): Transférer 1 ml de la solution étalon 4 ( $\rho_{\text{PSB } 4} = 0,016 \text{ mg/ml}$ ; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,01 \text{ mg/ml}$ ; 4.4).
- **Solution étalon 5** (concentration finale  $\rho_{\text{PSB } 5} = 0,004 \text{ mg/ml}$ ;  $\rho_{\alpha\text{-cholestane } 5} = 0,005 \text{ mg/ml}$ ): Transférer 1 ml de la solution étalon 5 ( $\rho_{\text{PSB } 5} = 0,008 \text{ mg/ml}$ ; 4.3) dans un tube à essai et ajouter 1 ml de la solution d' $\alpha$ -cholestane ( $\rho = 0,01 \text{ mg/ml}$ ; 4.4).

Injecter 1  $\mu\text{l}$  de la solution finale pour essai dans le système de CGL-HR en utilisant le système d'injection avec division.

D'autres quantités d'échantillons et d'autres injecteurs peuvent être utilisés à condition que le système de détection employé donne une réponse linéaire et soit conforme aux critères d'aptitude du système (10.2).

## 8.2 Séparation des TAG individuels de l'IRMM-801 par CGL-HR

L'IRMM-801 (4.1) doit être chauffé dans une étuve (5.2) jusqu'à fusion complète. Il convient que les pipettes (ou équipement similaire) utilisées pour transférer l'échantillon pendant les opérations de pesée soient portées à une température d'environ 55 °C dans une étuve afin d'éviter le fractionnement partiel de la matière grasse durant la manipulation des échantillons.

**Pour l'injection en tête de colonne à froid (ITCF):** Peser (5.1) environ 0,1 g d'IRMM-801 (4.1) dans une fiole jaugée (5.9) de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec de l'isooctane (4.5). Pipetter (5.10) 1 ml de la solution obtenue dans une autre fiole jaugée (5.9) de 50 ml et compléter jusqu'au repère avec le même solvant ( $\rho = 0,2 \text{ mg/ml}$ ). Injecter 0,5  $\mu\text{l}$  de la solution pour essai finale dans le système de CGL-HR en utilisant le système d'injection en tête de colonne à froid.

**Pour l'injection avec division:** Peser (5.1) environ 0,1 g d'IRMM-801 (4.1) dans une fiole jaugée (5.9) de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec de l'isooctane (4.5). Pipetter (5.10) 1 ml de la solution obtenue dans une autre fiole jaugée (5.9) de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec le même solvant ( $\rho = 1 \text{ mg/ml}$ ). Injecter 1  $\mu\text{l}$  de la solution pour essai finale dans le système de CGL-HR en utilisant le système d'injection avec division.