
**Café et dérivés du café — Dosage de
l'acrylamide — Méthodes par CLHP-
SM/SM et CG-SM après dérivation**

*Coffee and coffee products — Determination of acrylamide —
Methods using HPLC-MS/MS and GC-MS after derivatization*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 18862:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/205ae10c-404c-419b-842b-6c44f98fc5d5/iso-18862-2016)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/205ae10c-404c-419b-842b-6c44f98fc5d5/iso-18862-2016>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 18862:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/205ae10c-404c-419b-842b-6c44f98fc5d5/iso-18862-2016)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/205ae10c-404c-419b-842b-6c44f98fc5d5/iso-18862-2016>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2016

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs	1
6 Appareillage	3
7 Échantillonnage	4
8 Mode opératoire	5
8.1 Généralités.....	5
8.2 Préparation de l'extrait d'échantillon.....	5
8.3 Purification des extraits.....	5
8.3.1 Précipitation de Carrez.....	5
8.3.2 Extraction en phase solide.....	5
8.4 Analyse par CLHP-SM/SM.....	6
8.4.1 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	6
8.4.2 Identification et quantification par spectrométrie de masse (CLHP-SM/SM).....	6
8.5 Analyse par CG-SM.....	6
8.5.1 Dérivation et préparation de l'échantillon pour la chromatographie en phase gazeuse.....	6
8.5.2 Chromatographie en phase gazeuse.....	7
8.5.3 Identification et quantification par spectrométrie de masse.....	7
9 Étalonnage	8
9.1 Conseil d'ordre général.....	8
9.2 Détermination de la linéarité et définition de la plage de travail.....	8
9.3 Étalonnage avec une solution d'étalon interne.....	8
9.4 Détermination du taux de récupération spécifique du laboratoire.....	8
10 Évaluation	8
10.1 Critères d'identification.....	8
10.2 Calcul et résultats finaux.....	8
11 Données de fidélité	9
11.1 Généralités.....	9
11.2 Répétabilité.....	9
11.3 Reproductibilité.....	9
11.4 Taux de récupération.....	10
12 Incertitude de mesure	10
13 Rapport d'essai	10
Annexe A (informative) Caractéristiques de performance	11
Annexe B (informative) Exemples de matériaux absorbants	12
Annexe C (informative) Exemples de colonnes et de conditions d'analyse	13
Bibliographie	19

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/foreword.html.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 15, *Café*.

Introduction

Toutes les règles de sécurité existantes doivent être respectées lors de l'application du présent document.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 18862:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/205ae10c-404c-419b-842b-6c44f98fc5d5/iso-18862-2016)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/205ae10c-404c-419b-842b-6c44f98fc5d5/iso-18862-2016>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18862:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/205ae10c-404c-419b-842b-6c44f98fc5d5/iso-18862-2016>

Café et dérivés du café — Dosage de l'acrylamide — Méthodes par CLHP-SM/SM et CG-SM après dérivation

AVERTISSEMENT — Le présent document peut impliquer l'utilisation de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillages à caractère dangereux. Il n'est pas destiné à traiter de tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document de prendre les mesures appropriées pour assurer l'hygiène et la sécurité du personnel avant l'application du présent document et de satisfaire aux exigences réglementaires correspondantes.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie des méthodes de dosage de l'acrylamide dans le café et les dérivés du café par extraction à l'eau, purification par extraction en phase solide et dosage par CLHP-SM/SM et CG-SM. Il a été validé au cours d'une étude de validation de la méthode réalisée sur du café torréfié, du café soluble, des substituts de café et des dérivés du café dans des plages de concentration allant de 53 µg/kg à 612,1 µg/kg.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

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

3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

4 Principe

L'échantillon de café est extrait à l'eau ou, dans le cas de produits solubles, est dissous dans l'eau. Une purification par extraction en phase solide est utilisée pour éliminer les composés interférents de la matrice. Deux méthodes alternatives peuvent être utilisées pour le dosage: la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM/SM) ou, après une bromation de l'acrylamide, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Dans les deux cas, des solutions d'étalons internes marqués par un isotope sont utilisées.

5 Réactifs

AVERTISSEMENT — Étant donné les risques pour la santé liés à l'utilisation de l'acrylamide, des mesures préventives et de protection appropriées doivent être prises, comme l'utilisation d'une hotte aspirante, l'aspiration des solutions contenant de l'acrylamide uniquement avec

une pipette et le fait d'éviter tout contact avec la peau et les yeux ou toute inhalation de vapeur contenant de l'acrylamide.

S'ils sont disponibles, des réactifs de « qualité pour analyse de résidus » ou de « qualité réactif analytique » doivent être utilisés. Il convient que le niveau d'impuretés dans les réactifs contribuant au blanc soit négligeable. Le blanc doit être contrôlé régulièrement.

5.1 Eau, de qualité 1 selon l'ISO 3696, la qualité SM étant recommandée.

5.2 Gaz opératoires de grande pureté, adaptés pour la CG et la spectrométrie de masse selon les instructions du fabricant de l'appareil.

5.3 Solvants, tels que le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétonitrile, le n-hexane, la qualité SM étant recommandée.

5.4 Acrylamide, C_3H_5NO , d'une pureté > 98 %, substance de référence.

5.4.1 Solution mère d'acrylamide, concentration massique $\rho = 1\ 000\ \mu\text{g/ml}$.

Peser ($0,10 \pm 0,001$) g d'acrylamide dans une fiole jaugée de 100 ml et agiter dans 30 ml d'eau pour dissoudre l'acrylamide. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau et bien mélanger. La solution mère est stable pendant au moins 3 mois lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière à une température maximale de 6 °C.

Alternativement, une solution disponible dans le commerce ayant une concentration massique de $\rho = 1\ 000\ \mu\text{g/ml}$ peut être utilisée. Les informations fournies par le fabricant en ce qui concerne la stabilité de la solution doivent être suivies.

5.4.2 Solution d'étalonnage d'acrylamide, $\rho = 10\ \mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, transférer ($1,0 \pm 0,001$) ml de la solution mère d'acrylamide (5.4.1) dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau. Cette solution doit être conservée à l'abri de la lumière à une température maximale de 6 °C et elle doit être renouvelée tous les jours. En fonction de la plage de travail, des étapes de dilution supplémentaires peuvent être nécessaires.

5.5 Solution d'étalon interne de D3-acrylamide (acrylamide-2,3,3-d3), $C_3H_2D_3NO$, d'une pureté > 98 %, substance de référence.

5.5.1 Solution mère de D3-acrylamide (solution d'étalon interne).

Peser ($0,10 \pm 0,001$) g de D3-acrylamide dans une fiole jaugée de 100 ml et agiter dans 30 ml d'eau pour dissoudre le D3-acrylamide. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau et bien mélanger. La solution mère est stable pendant au moins 3 mois lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière à une température maximale de 6 °C.

Alternativement, une solution disponible dans le commerce ayant une concentration massique de $\rho = 1\ 000\ \mu\text{g/ml}$ peut être utilisée. Les informations fournies par le fabricant en ce qui concerne la stabilité de la solution doivent être suivies.

5.5.2 Solution d'étalon interne de D3-acrylamide.

À l'aide d'une pipette, transférer ($1,0 \pm 0,001$) ml de la solution mère de D3-acrylamide (5.5.1) dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau. Cette solution doit être conservée

à l'abri de la lumière à une température maximale de 6 °C et elle doit être renouvelée tous les jours. En fonction de la plage de travail, des étapes de dilution supplémentaires peuvent être nécessaires.

NOTE 1 Dans le cas de la CLHP-SM/SM, les solutions selon 5.4.1 à 5.5.2 peuvent être préparées en utilisant la phase mobile de CLHP comme solvant. La stabilité de ces solutions dépend de la phase mobile utilisée et doit être validée.

En cas d'utilisation de la CG-SM, toutes les solutions étalons selon 5.4.2 et 5.5.2 doivent être soumises à une étape de dérivation conformément à 8.5.1.

NOTE 2 À la place du D3-acrylamide, il est également possible d'utiliser de l'acrylamide $^{13}\text{C}_3$ pour la préparation de la solution d'étalon interne. Toutefois, dans les articles suivants, le mode opératoire et le calcul décrits s'appliquent uniquement au D3-acrylamide.

5.6 Eau de brome saturée.

Saturer de l'eau distillée avec du brome dans une fiole jaugée de 100 ml (munie d'un bouchon en verre), jusqu'à ce qu'une phase de brome se forme au fond de la fiole (environ 3,5 % de brome à 4 °C). Acidifier l'eau de brome à un pH d'environ 1 en utilisant de l'acide bromhydrique concentré (HBr, avec un poids spécifique de 1,48 g/cm³).

Conservée à 4 °C et à l'abri de la lumière, cette solution peut être utilisée pendant environ 4 semaines.

5.7 Bromure de potassium, KBr.

5.8 Thiosulfate de sodium (pentahydraté), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

5.9 Triéthylamine, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$.

5.10 Sulfate de sodium (anhydre, granulaire), Na_2SO_4 .

5.11 Solution de Carrez I.

Dissoudre 10,6 g d'hexacyanoferrate de potassium trihydraté (II) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau. Conservée à 4 °C et à l'abri de la lumière, cette solution est stable pendant 6 mois.

5.12 Solution de Carrez II.

Dissoudre 21,9 g d'acétate de zinc dihydraté $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau. Conservée à 4 °C et à l'abri de la lumière, cette solution est stable pendant 6 mois.

5.13 Tampon de borate, pH 8,6.

Mélanger 68 ml d'une solution de borate de sodium à 0,1 mol/l (20,12 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ par litre d'eau) et 32 ml d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l, $c(\text{HCl}) = 0,1\text{ mol/l}$, dans une fiole jaugée de 100 ml.

6 Appareillage

Utiliser le matériel courant de laboratoire et, en particulier, les appareils décrits de 6.1 à 6.14.

Le matériel et les parties du matériel qui entrent en contact avec l'échantillon et l'extrait doivent être exempts de résidus pouvant causer des valeurs à blanc. Il faut utiliser de préférence de la verrerie ou du matériel en acier inoxydable ou en PTFE (polytétrafluoroéthylène).

6.1 Balance analytique, réalisant des pesées à 0,1 mg près.

6.2 Moulin à café, pouvant moudre des grains de café torréfié.

- 6.3 Verrerie**, pour recueillir et stocker les extraits, de préférence en verre brun, telle que des flacons pour échantillons à usage manuel ou automatique munis d'un bouchon inerte (par exemple bouchon avec septum revêtu de PTFE).
- 6.4 Bain à ultrasons**, pouvant être maintenu à 40 °C.
- 6.5 Centrifugeuse de laboratoire**, convenant pour des tubes à centrifuger de 15 ml et 50 ml et avec une vitesse de centrifugation minimale de 2 000 *g*.
- 6.6 Tubes à centrifuger**, de 15 ml et 50 ml.
- 6.7 Fioles jaugées**, de 20 ml et 100 ml.
- 6.8 Pipettes, en verre ou automatiques**, convenant pour mesurer les plages de volume des solutions étalons et des dilutions d'extrait d'échantillon.
- 6.9 Cartouches en verre ou en polypropylène**, avec des adsorbants pour l'extraction en phase solide (SPE), et pour la purification des extraits en [8.3.2](#) et [8.5.1](#) (des exemples sont donnés dans le [Tableau B.1](#)).
- 6.10 Chromatographe liquide haute performance** (pour le mode opératoire d'essai selon [8.4](#)), muni d'une source électrospray (ESI) et d'une détection par spectrométrie de masse (CLHP-SM/SM); alimentation en gaz telle que spécifiée par le fabricant.
- 6.11 Colonne de CLHP** (pour le mode opératoire d'essai selon [8.4](#)), adaptée pour la chromatographie de l'acrylamide (des exemples sont donnés dans le [Tableau C.1](#)).
- 6.12 Chromatographe en phase gazeuse** (pour le mode opératoire d'essai selon [8.5](#)) avec détection par spectrométrie de masse (CG-SM) et alimentation en gaz opératoires ([5.2](#)) telle que spécifiée par le fabricant.
- 6.13 Colonne de CG** (pour le mode opératoire d'essai selon [8.5](#)), colonne capillaire adaptée pour la chromatographie de l'acrylamide (des exemples sont donnés dans le [Tableau C.2](#)).
- 6.14 Filtres à membrane**, filtres à seringues (par exemple, filtres en acétate de cellulose à 0,45 µm de taille de pore), adaptés pour la filtration de l'éluat d'échantillon issu de l'extraction en phase solide avant l'injection dans le système chromatographique.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Le mode opératoire d'échantillonnage doit faire l'objet d'un accord entre les parties intéressées. Un échantillon représentatif bien homogénéisé, qui n'a pas été endommagé ou altéré lors du transport ou du stockage, doit être utilisé.

Afin d'éviter des changements de concentration en acrylamide, l'analyse doit être effectuée peu après la réception de l'échantillon. Les échantillons doivent être conservés au frais, à une température inférieure à 6 °C, pendant au maximum 6 mois, à l'abri de la lumière, et ils doivent être exposés à température ambiante uniquement pour l'analyse.

La date de réception de l'échantillon, ainsi que la date de torréfaction ou la date limite de conservation doivent être documentées avec la date d'analyse.

8 Mode opératoire

8.1 Généralités

Pour éviter les pertes d'analyte, il est nécessaire que les échantillons soient protégés de la lumière pendant l'extraction et les autres étapes de préparation. C'est pourquoi il faut toujours utiliser du verre brun. Autrement, le contenu des récipients et des fioles doit être protégé de la lumière incidente par une feuille d'aluminium.

8.2 Préparation de l'extrait d'échantillon

Si nécessaire, moudre l'échantillon dans un moulin à café (6.2) et bien homogénéiser.

Peser 2 g d'échantillon homogénéisé de café torréfié, de café soluble ou de substitut de café ou 5 g de boisson à base de café liquide à 1 mg près à l'aide d'une balance analytique (6.1) et transférer dans un tube à centrifuger (6.6) de 50 ml.

Ajouter 2 ml de n-hexane dans le tube à centrifuger et agiter brièvement. Doper ensuite l'échantillon avec une solution d'étalon interne de D3-acrylamide à une concentration correspondant au niveau d'acrylamide attendu dans l'échantillon.

EXEMPLE Peser 2 g de café et ajouter 100 µl de solution d'étalon interne ($\rho = 10 \mu\text{g/ml}$), ce qui équivaut à une concentration massique d'acrylamide de 500 µg/kg dans l'échantillon de café.

Ajouter 20 ml d'eau distillée, agiter brièvement mais vigoureusement, puis soumettre aux ultrasons (6.4) pendant 15 min à environ 40 °C.

Attendre quelques minutes pour que la précipitation se produise et en cas de non-sédimentation des échantillons, centrifuger (6.5) pendant 15 min à 2 000 g pour séparer les matières solides en suspension. Avant la chromatographie liquide (8.4) ou la dérivation et la séparation par chromatographie en phase gazeuse (8.5) prélever 10 ml de la phase aqueuse inférieure et la soumettre à une purification supplémentaire selon 8.3. Prélever la phase aqueuse inférieure à l'aide d'une pipette en faisant passer cette dernière dans la phase supérieure d'hexane sans retirer la phase d'hexane. Si nécessaire, la phase d'hexane peut également être retirée avec précaution à l'aide d'une pipette Pasteur.

8.3 Purification des extraits

8.3.1 Précipitation de Carrez

Purifier l'extrait d'échantillon selon 8.2 par précipitation de Carrez. Ajouter 1 000 µl de solution de Carrez I (5.11) et agiter. Ajouter 1 000 µl de solution de Carrez II (5.12) et agiter à nouveau. Après un court temps d'exposition, centrifuger pendant 4 min à 2 000 g. Décanter le surnageant, prélever la phase aqueuse, laver le résidu avec 2 ml à 3 ml d'eau. Centrifuger et décanter à nouveau. Combiner les deux solutions aqueuses.

8.3.2 Extraction en phase solide

Purifier l'extrait d'échantillon après précipitation de Carrez (8.3.1) par extraction en phase solide (SPE) en utilisant successivement deux cartouches d'adsorbants différents (des exemples sont donnés dans le Tableau B.1). La première cartouche contient 500 mg de phase C18 et la seconde 500 mg de phase échangeuse d'ions. Les cartouches peuvent être utilisées en série. Si appropriée, une cartouche mixte peut être utilisée.

Conditionner les deux colonnes SPE selon les instructions du fabricant, successivement avec du méthanol et de l'eau distillée. Placer la totalité de l'extrait d'échantillon (8.3.1) au sommet de la colonne SPE supérieure (première colonne), laisser pénétrer et ajouter 2 ml à 3 ml d'eau. Recueillir l'éluat jusqu'à assèchement de la cartouche. Placer l'éluat au sommet de la seconde colonne échangeuse d'ions conditionnée (colonne inférieure), ajouter 2 ml à 3 ml d'eau et recueillir l'éluat. Une élution complète