
**Corps gras d'origines animale et
végétale — Détermination des esters
de chloropropanediols (MCPD) et
d'acides gras et des esters de glycidol
et d'acides gras par CPG/SM —**

**Partie 2:
Méthode par transestérification
alcaline lente et mesure pour le
2-MCPD, le 3-MCPD et le glycidol**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f66ff00-5805-427a-8a27-5a1a725c-557b/iso-18363-2-2018>

Animal and vegetable fats and oils — Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS —

Part 2: Method using slow alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 18363-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fb66ff00-5805-427a-8a27-5f9edb1e5203/iso-18363-2-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

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	2
5 Réactifs	3
5.1 Généralités	3
5.2 Solvants et produits chimiques	3
5.3 Composés étalons et composés de référence	3
5.4 Solutions de travail **	4
5.5 Autres solutions	4
6 Appareillage	5
7 Échantillon	5
7.1 Échantillonnage	5
7.2 Préparation de l'échantillon pour essai	5
8 Mode opératoire	5
8.1 Ajout d'étalon de substitution et homogénéisation	5
8.2 Clivage des esters et transformation du glycidol	6
8.3 Élimination de la matrice	6
8.4 Dérivatisation	6
8.5 Références relatives à la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)	6
9 Expression des résultats	7
9.1 Détermination du glycidol lié	7
9.2 Détermination du 2-MCPD lié	9
9.3 Détermination du 3-MCPD lié	9
9.4 Détermination du degré de clivage des diesters	9
9.5 Contrôle qualité	10
10 Notes	10
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes pertinents et d'évaluation des données basés sur de l'huile de palme «à faible teneur en MCPD»	13
Annexe B (informative) Résultats des essais interlaboratoires	20
Bibliographie	22

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 nature volontaire des normes, 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 www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 18363 se trouve sur le site web de l'ISO.

Introduction

La série ISO 18363 est un ensemble de Normes internationales pouvant être utilisé pour la détermination des esters de MCPD et de glycidol. Cette introduction décrit les méthodes spécifiées dans les trois documents actuellement publiés ou proposés pour que les analystes puissent décider des méthodes qui conviennent à leurs applications. L'application détaillée de chaque méthode figure dans le domaine d'application de la méthode concernée.

L'ISO 18363-1[1] est une méthode différentielle équivalente à la norme C-VI 18 (10)[2] de la DGF et identique à la méthode officielle Cd 29c-13[3] de l'AOCs. En résumé, elle repose sur la libération rapide par catalyse alcaline de 3-MCPD et de glycidol à partir de leurs dérivés esters. Le glycidol est par la suite converti en 3-MCPD. Elle comprend deux parties. La première partie (A) permet de déterminer la somme des esters de 3-MCPD et des esters de glycidol, tandis que la seconde partie (B) ne détermine que les esters de 3-MCPD. Les deux analyses reposent sur la libération des analytes cibles, le 3-MCPD et le glycidol, à partir des esters par alcoololyse en présence d'un catalyseur alcalin à température ambiante. Dans la partie A, une solution acidifiée de chlorure de sodium est utilisée pour interrompre la réaction qui induit par la suite la conversion du glycidol en 3-MCPD. Il n'est par conséquent plus possible de faire la distinction entre le 3-MCPD et le glycidol dans la partie A. Dans la partie B, la réaction est interrompue par ajout d'une solution saline acidifiée exempte de chlorure qui évite aussi la conversion du glycidol en MCPD. La partie B permet donc de déterminer la véritable teneur en 3-MCPD. Enfin, la teneur en glycidol de l'échantillon est proportionnelle à la différence entre les deux analyses (A - B) et peut être calculée lorsque le coefficient de transformation du glycidol en 3-MCPD a été déterminé. L'ISO 18363-1 s'applique à la détermination rapide des esters de 3-MCPD et de glycidol dans les corps gras d'origine végétale raffinés et non raffinés. L'ISO 18363-1 peut également s'appliquer aux graisses animales et aux huiles de friture usagées, mais une étude de validation doit être menée avant de procéder à l'analyse de ces matrices. Les analytes libres éventuellement contenus dans l'échantillon sont habituellement inclus dans les résultats, mais le document ne permet pas de faire la distinction entre les analytes libres et les analytes liés. Néanmoins, les études disponibles au moment de la publication de la présente norme ne révèlent aucune teneur en analytes libres aussi élevée que la teneur en analytes estérifiés dans les corps gras d'origine végétale raffinés. En principe, l'ISO 18363-1 peut également être modifiée de façon à permettre la détermination du 2-MCPD,[4] mais une fois encore, une étude de validation doit être menée avant d'analyser cet analyte.

Le présent document correspond à la méthode officielle Cd 29b-13[5][6] de l'AOCs. Pour en savoir plus sur les données de validation correspondantes, voir l'Annexe B. En résumé, elle repose sur une libération alcaline lente de MCPD et de glycidol à partir des formes esters. Le glycidol est par la suite converti en 3-MCPD. Le présent document comprend deux préparations d'échantillons qui se distinguent par l'utilisation d'étalons internes. Les deux préparations sont utilisées pour la détermination des esters de 2-MCPD et de 3-MCPD. Un résultat préliminaire pour le glycidol issu des formes esters est déterminé dans la partie A. Comme le 3-MCPD présent dans l'échantillon sera partiellement converti en glycidol lors de la préparation de l'échantillon, la partie B sert à quantifier la teneur en glycidol issue de cette conversion qui est ensuite soustraite du résultat préliminaire obtenu pour le glycidol dans la partie A. L'utilisation d'isomères isotopiques de MCPD libres dans l'analyse A et de formes isotopiques d'esters de 2-MCPD et de 3-MCPD dans la partie B permet de surveiller le rendement du clivage des esters. Les analyses A et B reposent toutes les deux sur la libération des analytes cibles, 2-MCPD, 3-MCPD et glycidol, à partir des esters dans le cadre d'une alcoololyse lente en présence d'un catalyseur alcalin dans le froid. Dans les deux préparations d'échantillons, la réaction est interrompue par l'ajout d'une solution acidifiée et concentrée de bromure de sodium de façon à transformer le glycidol instable et volatil en 3-MCPD qui présente des propriétés comparables au 3-MCPD en matière de stabilité et de performances chromatographiques. De plus, l'excès important d'ions bromure empêche la formation non souhaitée de 3-MCPD à partir du glycidol dans les échantillons contenant naturellement des quantités de chlorure. Le présent document s'applique à la détermination des esters de 3-MCPD, de 2-MCPD et de glycidol dans les corps gras d'origine végétale raffinés et non raffinés. Il s'applique également aux graisses animales et aux huiles de friture usagées, mais une étude de validation doit être menée avant de procéder à l'analyse de ces matrices. Les analytes libres éventuellement contenus dans l'échantillon sont habituellement inclus dans les résultats, mais le document ne permet pas de faire la distinction entre les analytes libres et les analytes liés. Néanmoins, les études disponibles au moment de la publication du présent document

ne révèlent aucune teneur en analytes libres aussi élevée que la teneur en analytes estérifiés dans les corps gras d'origine végétale.

L'ISO 18363-3[2] correspond à la méthode officielle Cd 29a-13[8][9] de l'AOCs. En résumé, elle repose sur la conversion des esters de glycidol en esters de 3-MBPD et une libération lente par catalyse acide du MCPD et du MBPD à partir des formes esters. L'ISO 18363-3 repose sur la préparation d'un échantillon unique dans lequel les esters de glycidol sont transformés en monoesters de MBPD puis les analytes libres de 2-MCPD, 3-MCPD et 3-MBPD sont libérés par alcoololyse lente en présence d'un catalyseur acide. Le 3-MBPD représente la véritable teneur en glycidol issu des formes esters. L'ISO 18363-3 peut être appliquée pour la détermination des esters de 2-MCPD, 3-MCPD et de glycidol dans les corps gras d'origine végétale raffinés et non raffinés. Elle peut également s'appliquer aux graisses animales et aux huiles de friture usagées, mais une étude de validation doit être menée avant de procéder à l'analyse de ces matrices. La méthode est adaptée à l'analyse d'analytes liés (estérifiés), mais si nécessaire, l'ISO 18363-3 peut également être suivie sans la conversion initiale des esters de glycidol. Dans cette configuration, les formes libres et liées du 2-MCPD et du 3-MCPD sont généralement toutes deux incluses dans les résultats et la teneur en analytes libres peut être calculée comme la différence entre deux déterminations réalisées dans les deux configurations. Néanmoins, les études disponibles au moment de la publication du présent document ne révèlent aucune teneur en analytes libres aussi élevée que la teneur en analytes estérifiés dans les corps gras d'origine végétale.

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

[ISO 18363-2:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f66ff00-5805-427a-8a27-5f9edb1e5203/iso-18363-2-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f66ff00-5805-427a-8a27-5f9edb1e5203/iso-18363-2-2018>

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination des esters de chloropropanediols (MCPD) et d'acides gras et des esters de glycidol et d'acides gras par CPG/SM —

Partie 2:

Méthode par transestérification alcaline lente et mesure pour le 2-MCPD, le 3-MCPD et le glycidol

1 Domaine d'application

Le présent document décrit un mode opératoire permettant la détermination parallèle du glycidol ainsi que du 2-MCPD et du 3-MCPD présents sous forme liée ou libre dans les corps gras. La méthode repose sur un clivage des esters par catalyse alcaline, une transformation du glycidol ainsi libéré en monobromopropanediol (MBPD) et une dérivation des diols libres (MCPD et MBPD) en présence d'acide phénylboronique (PBA). Même si les corps gras ne sont censés contenir que des quantités faibles voire négligeables de MCPD libre et de glycidol libre, une teneur importante augmenterait proportionnellement la détermination des analytes liés.

La présente méthode est applicable aux corps gras solides et liquides. Le présent document peut également s'appliquer aux graisses animales et aux huiles de friture usagées, mais une étude de validation est menée avant de procéder à l'analyse de ces matrices.

Le lait et les produits laitiers (ou les corps gras issus du lait et des produits laitiers) sont exclus du domaine d'application du présent document.

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

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

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

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

3.1

2-MCPD lié

somme de tous les dérivés de 2-MCPD soumis à un clivage par alcoolyse en présence d'un catalyseur alcalin

Note 1 à l'article: La teneur en 2-MCPD lié est consignée en milligrammes par kilogramme (mg/kg).

3.2

3-MCPD lié

somme de tous les dérivés de 3-MCPD soumis à un clivage par alcoolyse en présence d'un catalyseur alcalin

Note 1 à l'article: La teneur en 3-MCPD lié est consignée en milligrammes par kilogramme (mg/kg).

3.3

glycidol lié

somme de tous les dérivés du glycidol soumis à un clivage par alcoolyse en présence d'un catalyseur alcalin

Note 1 à l'article: La teneur en glycidol lié est consignée en milligrammes par kilogramme (mg/kg).

4 Principe

Pour la détermination du 2-MCPD lié, du 3-MCPD lié et du glycidol lié sous forme de 2-MCPD libre, de 3-MCPD libre et de 3-MBPD libre (3-monobromopropanediol), deux fractions aliquotes (A et B) de l'échantillon sont mis en solution avec les étalons de substitution (d_5 -2-MCPD, d_5 -3-MCPD, ester de d_5 -glycidol pour l'analyse A et d_5 -2-MCPD-1,3-diester, d_5 -3-MCPD-1,2-diester pour l'analyse B) puis sont dissoutes dans de l'éther diéthylique. Les deux analyses sont menées en parallèle. L'ajout d'une solution diluée d'hydroxyde de sodium ou de méthoxyde de sodium dans du méthanol à froid va permettre la formation de 2-MCPD libre, de 3-MCPD libre et de glycidol libre sur une période de 8 h à 12 h. Cette réaction est interrompue par ajout d'un excès de bromure de sodium en solution acide. En milieu acide, le glycidol libre réagit avec le bromure inorganique pour former du 3-MBPD et une petite quantité de 2-MBPD. Les composés apolaires indésirables de l'échantillon sont éliminés par double extraction de la phase aqueuse avec de l'isohexane. Les analytes, ainsi que les étalons de substitution, sont transférés dans une phase organique par extractions multiples de la phase aqueuse à l'aide d'éther diéthylique, d'acétate d'éthyle ou d'un mélange des deux solvants. La dérivatisation se produit dans la phase organique par réaction avec l'acide phénylboronique (PBA). Afin d'éliminer l'excès de PBA, concentrer les analytes et les transférer dans un solvant organique inerte. L'extrait d'échantillon est placé sur une petite quantité de sulfate de sodium anhydre puis il est évaporé à sec sous flux d'azote avant d'être à nouveau dissout dans de l'iso-octane pour mesurage par CPG/SM.

La transestérification par catalyse alcaline à froid permet de réduire au minimum la transformation non souhaitée du 3-MCPD en glycidol et qui est importante à température ambiante. Néanmoins, en présence de grandes quantités de 3-MCPD, même une faible transformation en glycidol pourrait augmenter artificiellement les résultats du glycidol de l'analyse A. Afin d'obtenir des résultats de glycidol corrects, même en présence d'une grande quantité de 3-MCPD, l'analyse B permet de déterminer la transformation non souhaitée du 3-MCPD - glycidol en déterminant la teneur en d_5 -glycidol générée à partir du d_5 -3-MCPD-diester lors de la préparation de l'échantillon. Le coefficient de transformation correspondant permet de corriger la valeur de glycidol provenant de l'analyse A. Un autre point à prendre en compte est que le 3-MCPD est converti environ 1,2 fois plus rapidement en 3-MBPD via le glycidol que le 3-MCPD- d_5 en 3-MBPD- d_5 via le glycidol- d_5 . Par conséquent, il faut tenir compte du facteur isotopique $I = 1,2$ dans la détermination quantitative de la quantité de glycidol générée accidentellement à partir du 3-MCPD non marqué lors du traitement alcalin de l'analyse A.

La quantification des analytes est réalisée par un étalonnage interne à un point en utilisant les esters d_5 comme étalons de substitution. Aucun étalonnage externe n'est donc nécessaire. De même, aucun rendement d'analyte ne doit être pris en compte. Cependant, il se peut que les taux de clivage diffèrent entre les monoesters et les diesters de MCPD, et comme seuls les diesters de d_5 -MCPD servent d'étalons internes, il convient de déterminer le degré de clivage des esters sur une grande étendue. C'est pourquoi le degré de variation du clivage des esters est surveillé en calculant la différence entre les résultats du 3-MCPD obtenus pour les analyses A et B. Pour en savoir plus sur la façon de tirer des données quantitatives à partir des chromatogrammes correspondants, voir l'expression des résultats^[9] et l'Annexe A.

Comme du 3-MCPD peut apparaître dans certains polymères utilisés pour humidifier des résines de renfort et dans d'autres buts, il peut également apparaître suite à l'utilisation de consommables tels que les filtres ou les flacons à bouchon vissé. Conditionner la verrerie entre 400 °C et 500 °C peut réduire ce risque, la meilleure solution restant toutefois l'utilisation de matériaux non contaminés.

5 Réactifs

5.1 Généralités

AVERTISSEMENT — Le présent document exige la manipulation des substances dangereuses. Les mesures de sécurité sur les plans technique, organisationnel et du personnel doivent être suivies.

Sauf indication contraire, des réactifs analytiquement purs doivent être utilisés. L'eau doit être de qualité 3 conformément à ISO 3696.

5.2 Solvants et produits chimiques

5.2.1 Toluène.

5.2.2 *tert*-Butyl méthyl éther (tBME), (2-méthoxy-2-méthylpropane).

5.2.3 Méthanol.

5.2.4 *iso*-hexane (2-méthylpentane).

5.2.5 Acétate d'éthyle.

5.2.6 Éther diéthylique.

5.2.7 *iso*-octane.

5.2.8 Sulfate de sodium anhydre, poudre.

5.3 Composés étalons et composés de référence

5.3.1 2-MCPD.

5.3.2 2-MCPD-d₅.

5.3.3 2-MCPD-1,3-*bis*-stéaroyléster *.

5.3.4 2-MCPD-d₅-1,3-*bis*-stéaroyléster *.

5.3.5 3-MCPD.

5.3.6 3-MCPD-d₅.

5.3.7 3-MCPD-1,2-*bis*-palmitoyléster *.

5.3.8 3-MCPD-d₅-1,2-*bis*-palmitoyléster *.

5.3.9 Oléate de glycidyle *.

5.3.10 Oléate de glycidyle-d₅ *.

* Il est permis de substituer ces produits par d'autres esters d'acides gras des analytes disponibles dans le commerce.

5.4 Solutions de travail **

5.4.1 2-MCPD: 10,0 µg/ml dans du méthanol.

5.4.2 2-MCPD-d₅: 10,0 µg/ml dans du méthanol.

5.4.3 3-MCPD: 10,0 µg/ml dans du méthanol.

5.4.4 3-MCPD-d₅: 10,0 µg/ml dans du méthanol.

5.4.5 2-MCPD-1,3-*bis*-stéaroyléster: 29,1 µg/ml; équivalent à 5,0 µg/ml de 2-MCPD libre dans du toluène.

5.4.6 2-MCPD-d₅-1,3-*bis*-stéaroyléster: 29,3 µg/ml dans du toluène; équivalent à 5,0 µg/ml de 2-MCPD libre.

5.4.7 3-MCPD-1,2-*bis*-palmitoyléster: 26,6 µg/ml dans du toluène; équivalent à 5,0 µg/ml de 2-MCPD libre.

5.4.8 3-MCPD-d₅-1,2-*bis*-palmitoyléster: 26,8 µg/ml dans du toluène; équivalent à 5,0 µg/ml de 2-MCPD libre.

5.4.9 Oléate de glycidyle: 22,8 µg/ml dans du toluène; équivalent à 5,0 µg/ml de glycidol libre.

5.4.10 Oléate de glycidyle-d₅: 23,2 µg/ml dans du toluène; équivalent à 5,0 µg/ml de glycidol libre.

** Il est permis de substituer ces concentrations par d'autres concentrations de solutions de travail.

5.5 Autres solutions

5.5.1 **Solution d'hydroxyde de sodium.** Peser 0,25 g d'hydroxyde de sodium fraîchement broyé et les placer dans un flacon en plastique de 100 ml. Ajouter 100 ml de méthanol et fermer hermétiquement le flacon. Agiter vigoureusement (à l'aide d'un agitateur de type vortex) jusqu'à dissolution complète. Stocker au congélateur entre -22 °C et -25 °C (voir [10.1](#)).

5.5.2 **Solution acidifiée de bromure de sodium.** Peser 600 g de bromure de sodium et les placer dans une fiole jaugée en verre de 1 l munie d'un bouchon vissé, puis compléter avec de l'eau déionisée jusqu'à 1 l. Acidifier le mélange avec 3 ml d'acide *ortho*-phosphorique (à 85 %), fermer hermétiquement et agiter (à l'aide d'un agitateur de type vortex) jusqu'à obtention d'une solution transparente. 600 µl de cette solution doivent neutraliser 350 µl de solution d'hydroxyde de sodium ([5.5.1](#)). Ajuster la valeur du pH dans la plage acide (pH 3 à pH 1). Stocker la solution au congélateur entre -22 °C et -25 °C (voir [10.1](#)).

5.5.3 **Solution saturée d'acide phénylboronique (PBA) dans de l'éther diéthylique.** Placer environ 200 mg de PBA dans un flacon à bouchon vissé de 10 ml rempli d'éther diéthylique. Bien agiter puis laisser décanter le PBA non dissout. Aux fins de la dérivation, utiliser uniquement le surnageant transparent.

6 Appareillage

- 6.1 Pipettes Eppendorf** (par exemple de 10 µl à 100 µl, de 10 µl à 200 µl, de 100 µl à 1 000 µl).
- 6.2 Pipettes à piston et volumétriques**, différentes tailles.
- 6.3 Fioles jaugées**, différentes tailles.
- 6.4 Balance analytique**, précision de lecture de 0,000 1 g, précision de pesée de 0,001 g.
- 6.5 Flacons à bouchon vissé** (d'une capacité de 2 ml environ) et bouchons à vis avec septum recouverts de polytétrafluoroéthylène (PTFE).
- 6.6 Pipettes Pasteur et poires à pipeter.**
- 6.7 Micro inserts** (d'une capacité d'environ 200 µl) pour flacons à bouchon vissé (d'une capacité de 2 ml environ).
- 6.8 Équipement générateur de flux d'azote.**
- 6.9 Système CPG/SM avec injecteur à température programmable.**
- 6.10 Colonne chromatographique en silice fondue**, phase stationnaire 50 % diphényl/50 % diméthylpolysiloxane, longueur 30 m, diamètre intérieur 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm, à faible ressuage pour SM, avec précolonne.
- La précolonne, qu'il convient de remplacer périodiquement, piège les composants non volatils et permet donc de prolonger la durée de vie de la colonne principale.

7 Échantillon

7.1 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la présente méthode. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 5555[10].

7.2 Préparation de l'échantillon pour essai

Prélever directement des quantités aliquotes d'échantillons liquides. Faire fondre les matières grasses solides ou semi-solides dans une étuve à dessiccation ou un bain-marie à environ 80 °C. Pour les matières grasses ayant un point de fusion élevé, la température peut être augmentée par paliers de 10 °C jusqu'à déclenchement du processus de fusion. Prélever des quantités aliquotes d'échantillons contenant une teneur en eau plus élevée sans fusion pour éviter toute séparation de phase.

8 Mode opératoire

NOTE Voir 10.2.

8.1 Ajout d'étalon de substitution et homogénéisation

Peser deux quantités aliquotes de (100 ± 0,5) mg de l'échantillon et les placer dans deux flacons à bouchon vissé d'une capacité d'environ 2 ml, ou peser avec précision deux quantités aliquotes d'environ 100 mg de l'échantillon et veiller à obtenir un bilan massique correct en termes de quantification.

Ajouter dans le flacon d'analyse A 50 µg de chacune des solutions de travail étalons à base de 2-MCPD-d₅ et de 3-MCPD-d₅ (5.4.2 et 5.4.4). Ajouter par pipetage dans le flacon d'analyse A 100 µl de solution de travail étalon d'ester de glycidol-d₅ (5.4.10). Transférer dans le flacon d'analyse B 100 µl de solution de travail étalon de 2-MCPD-d₅-bis-ester (5.4.6) et 100 µl de solution de travail étalon de 3-MCPD-d₅-bis-ester (5.4.8). Ajouter à chaque échantillon 600 µl d'éther diéthylique puis agiter (à l'aide d'un agitateur de type vortex) les mélanges jusqu'à dissolution complète. En cas d'échantillon à point de fusion élevé, les flacons peuvent exiger un léger chauffage.

8.2 Clivage des esters et transformation du glycidol

Placer au congélateur les deux flacons d'analyse pendant au moins 15 min pour abaisser leur température entre -22 °C et -25 °C (une précipitation à ce stade de la préparation de l'échantillon n'est pas un problème). Ajouter dans chaque flacon d'analyse 350 µl de solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (5.5.1). Pour procéder au clivage des esters, fermer les flacons, les agiter brièvement (à l'aide d'un agitateur de type vortex) et les conserver pendant au moins 16 h entre -22 °C et -25 °C. Interrompre les réactions à l'aide de 600 µl de solution acidifiée de bromure de sodium (5.5.2) stockée entre -22 °C et -25 °C. Agiter brièvement (à l'aide d'un agitateur de type vortex) les solutions et les placer sous un léger courant d'azote pour réduire le volume de la phase organique à environ 100 µl. Ajouter aux deux flacons 600 µl d'*iso*-hexane, boucher les flacons et les agiter vigoureusement (à l'aide d'un agitateur de type vortex). Laisser reposer les solutions à température ambiante pendant environ 5 à 10 min pour achever la transformation du glycidol en MBPD (voir 10.3).

NOTE D'autres plages de température peuvent être appliquées pour procéder au clivage des esters si une validation de méthode a été réalisée. Il est important de garder en tête que travailler à une température supérieure à -22 °C entraîne une augmentation de la conversion du 3-MCPD en glycidol. L'incertitude de la détermination de la teneur en glycidol peut alors augmenter.

8.3 Élimination de la matrice

Éliminer la phase organique à l'aide d'une pipette Pasteur. Laver la phase aqueuse de chaque flacon d'analyse avec 600 µl d'*iso*-hexane supplémentaires.

8.4 Dérivatisation

À l'aide de pipettes Pasteur neuves, procéder à l'extraction de chaque flacon d'analyse à trois reprises avec 600 µl d'un mélange 3:2 (v:v) d'éther diéthylique/acétate d'éthyle. Veiller à ce que la pipette ne touche pas la phase aqueuse. Pour chaque flacon d'analyse A et B, réunir les extraits organiques dans un nouveau flacon à bouchon vissé contenant une petite quantité de sulfate de sodium anhydre. Si l'agent déshydratant devient collant, transférer la solution dans un nouveau flacon à bouchon vissé contenant du sulfate de sodium neuf. Ajouter 20 µl du réactif de dérivation (5.5.3) aux deux extraits organiques pour procéder à la dérivation. Si la réaction de dérivation donne une faible réponse de signal de l'analyte, augmenter la quantité d'agent de dérivation jusqu'à ce que le rapport signal sur bruit du chromatogramme correspondant n'augmente pas. La quantité maximale de réactif de dérivation pouvant être utilisée est limitée par la capacité individuelle du système de chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse à éliminer l'excès de PBA. Pour finaliser la réaction de dérivation et éliminer l'excès de réactif, évaporer à sec les deux flacons d'analyse sous un léger flux d'azote. Redissoudre les fractions solubles dans environ 300 µl à 500 µl d'*iso*-octane et agiter vigoureusement (à l'aide d'un agitateur de type vortex) le mélange pendant quelques secondes. Pour les mesures CPG/SM, transférer une partie de chaque solution dans un micro-insert de 200 µl.

8.5 Références relatives à la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

8.5.1 Chromatographie en phase gazeuse: volume d'injection: de 1 µl à 2 µl.

8.5.2 Gaz vecteur: hélium 4.6 (99,996 %) ou hélium 5.0 (99,999 %), débit constant de 1 ml/min à 1,5 ml/min.