
**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 4:

**Méthode par transestérification
alcaline rapide et mesure pour le
2-MCPD, le 3-MCPD et le glycidol par
CPG-SM/SM**

<https://standards.iteh.ai/en/standards/ISO/18363-4:2021/6a0f3d-ce9f-4dc1-b608-ccc5ba1a674d/iso-18363-4-2021>

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

Part 4: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol by GC-MS/MS



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18363-4:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/376a0f3d-ce9f-4dc1-b608-ccc5ba1a674d/iso-18363-4-2021>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2021

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

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	2
5.1 Généralités.....	2
5.2 Composés étalons et composés de référence.....	3
5.3 Solutions étalons.....	3
5.3.1 Généralités.....	3
5.3.2 Solutions mères.....	3
5.3.3 Solutions de travail.....	4
5.4 Autres réactifs.....	4
5.5 Solutions de réactifs.....	5
6 Appareillage	5
7 Transport et stockage	6
7.1 Échantillonnage.....	6
7.2 Préparation de l'échantillon pour essai.....	6
7.3 Conditions de conservation.....	6
8 Mode opératoire	6
8.1 Préparation de l'échantillon pour essai.....	6
8.2 Préparation de la droite d'étalonnage.....	7
8.3 Paramètres relatifs à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CPG/SM).....	8
9 Expression des résultats	9
9.1 Généralités.....	9
9.2 Quantification des esters de 2-MCPD et 3-MCPD.....	9
9.3 Quantification des esters de glycidol.....	11
9.4 Contrôle qualité.....	13
10 Notes	14
11 Fidélité	15
11.1 Généralités.....	15
11.2 Répétabilité.....	15
11.3 Reproductibilité entre jours.....	15
Annexe A (normative) Tableaux explicatifs	16
Annexe B (informative) Résultats statistiques de l'étude comparative interlaboratoires ISO	18
Annexe C (informative) Chromatogrammes	22
Bibliographie	24

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*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 307, *Oléagineux, corps gras d'origines végétale et animale et leurs co-produits – Méthodes d'échantillonnage et d'analyse*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

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

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.

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 différentes parties 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 est une méthode différentielle équivalente à la norme C-VI 18 (10)^[9] de la DGF et identique à la méthode officielle Cd 29c-13^[6] 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 et induire 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 ainsi 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 corps gras de friture usagés, 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, mais une fois encore, une étude de validation doit être menée avant d'analyser cet analyte.

L'ISO 18363-2 correspond à la méthode officielle Cd 29b-13^[5] de l'AOCS. 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. L'ISO 18363-2 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 les esters de glycidol est déterminé dans la partie A. Comme le 3-MCPD présent dans l'échantillon est partiellement converti en glycidol lors de la préparation de l'échantillon, la partie B sert à quantifier la teneur en glycidol issue de cette transformation 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. L'ISO 18363-2 est applicable 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. Elle s'applique également aux graisses animales et aux corps gras de friture usagés, 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 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 correspond à la méthode officielle Cd 29a-13^[4] de l'AOCs. En résumé, elle repose sur la transformation 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 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 s'applique à la détermination des esters de 2-MCPD, de 3-MCPD et de glycidol dans les corps gras d'origine végétale raffinés et non raffinés. Elle s'applique également aux graisses animales et aux corps gras de friture usagés, 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 cela est exigé, l'ISO 18363-3 peut également être mise en œuvre sans la transformation initiale des esters de glycidol. Dans cette configuration, les formes libres et liées du 2-MCPD et du 3-MCPD sont 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 ne révèlent aucune teneur en analytes libres aussi élevée que la teneur en analytes estérifiés dans les corps gras d'origine végétale.

Le présent document spécifie un mode opératoire rapide reposant sur un clivage alcalin rapide des esters de MCPD et de glycidol. Le glycidol libéré est par la suite converti en 3-MBPD. Le pH du clivage alcalin rapide entraîne généralement la transformation partielle des MCPD libérés en glycidol au cours du clivage des esters, conduisant à une surestimation de la teneur en esters de glycidol de l'échantillon. En ajoutant deux étalons internes distincts d'ester de 3-MCPD et d'ester de glycidol marqués aux isotopes, il est possible de quantifier la quantité de glycidol marqué résultant de la dégradation de l'étalon interne libéré. Cette information peut être utilisée pour corriger la surestimation du glycidol issu des esters de glycidol par le glycidol issu du 3-MCPD. Les deux mêmes étalons internes sont utilisés pour la quantification des esters de MCPD et des esters de glycidol, nécessitant la préparation d'un seul échantillon pour quantifier les esters de 2-MCPD, 3-MCPD et de glycidol. De même que dans l'ISO 18363-1, l'ISO 18363-2 et l'ISO 18363-3, les MCPD et 3-MBPD libérés sont dérivés avec de l'acide phénylboronique avant l'analyse par CPG-SM/SM. Au contraire des autres parties de la série ISO 18363, le présent document exige un appareil de type CPG-SM/SM pour détecter sans ambiguïté chaque MBPD (marqué aux isotopes) requis pour une quantification exacte du glycidol issu des esters de glycidol. Le présent document est applicable 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. Elle s'applique également aux graisses animales et aux corps gras de friture usagés, 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 inclus dans les résultats, mais le document ne permettra 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.

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 4:

Méthode par transestérification alcaline rapide et mesure pour le 2-MCPD, le 3-MCPD et le glycidol par CPG-SM/SM

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie un mode opératoire rapide de détermination simultanée des esters de 2-MCPD (2-MCPD lié), des esters de 3-MCPD (3-MCPD lié) et des esters de glycidol (glycidol lié) en une seule analyse, reposant sur un clivage des esters en présence d'un catalyseur alcalin et une dérivation des analytes clivés (libres) avec de l'acide phénylboronique (PBA) avant l'analyse par CPG-SM/SM. La surestimation de la teneur en esters de glycidol est corrigée par l'ajout d'un ester de 3-MCPD marqué aux isotopes, ce qui permet la quantification du glycidol issu du 3-MCPD pendant le mode opératoire.

Cette méthode est applicable aux corps gras solides et liquides. Le présent document s'applique également aux graisses animales et aux corps gras de friture usagés, mais ces matrices n'étaient pas incluses dans la validation. Pour ces trois analytes, la limite de quantification (LQ) est de 0,1 mg/kg et la limite de détection (LOD) est de 0,03 mg/kg.

Le lait et les produits laitiers (ou les corps gras issus du lait et des produits laitiers), les formules infantiles, les émulsifiants, les acides gras libres et autres matrices dérivées de corps gras sont exclus du domaine d'application du présent document.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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

quantité de 2-MCPD obtenu par clivage de ses formes estérifiées (liées) par transestérification en présence d'un catalyseur alcalin conformément à la méthode de référence

Note 1 à l'article: La teneur en 2-MCPD est calculée et consignée sous forme de fraction massique, exprimée en milligrammes par kilogramme (mg/kg).

3.2 3-MCPD lié

quantité de 3-MCPD obtenu par clivage de ses formes estérifiées (liées) par transestérification en présence d'un catalyseur alcalin conformément à la méthode de référence

Note 1 à l'article: La teneur en 3-MCPD est calculée et consignée sous forme de fraction massique, exprimée en milligrammes par kilogramme (mg/kg).

3.3 glycidol lié

quantité de glycidol obtenu par clivage de ses formes estérifiées (liées) par transestérification en présence d'un catalyseur alcalin conformément à la méthode de référence

Note 1 à l'article: La teneur en glycidol est calculée et consignée sous forme de fraction massique, exprimée en milligrammes par kilogramme (mg/kg).

4 Principe

L'échantillon de corps gras est dissous dans du toluène et du tert-butyl-méthyl-éther, et les étalons internes (diester 3-MCPD-¹³C₃ et ester de glycidol pentadeutééré) sont ajoutés. L'échantillon est ensuite refroidi à 10 °C avant de commencer la transestérification alcaline par l'ajout d'une solution de méthylate de sodium dans du méthanol. Après 12 min d'incubation à 10 °C, le mélange échantillon est acidifié avec une solution acide de bromure de sodium pour transformer le glycidol libéré en 3-MBPD. Les esters méthyliques d'acides gras produits au cours de la transestérification sont éliminés par une double extraction de la phase organique. Pour finir, l'échantillon purifié (contenant les analytes clivés [libres]) est dérivé avec de l'acide phénylboronique avant l'analyse par CPG-SM/SM.

La quantification des esters de 2-MCPD et de 3-MCPD repose sur le rapport des signaux 2-MCPD/3-MCPD-¹³C₃ et 3-MCPD/3-MCPD-¹³C₃, respectivement. La quantification des esters de glycidol repose sur le rapport des signaux 3-MBPD/3-MBPD-d5. La quantité de 3-MBPD-¹³C₃ formée après la réaction de transestérification correspond à la quantité de 3-MCPD-¹³C₃ libérée qui s'est transformée en glycidol du fait des conditions de la transestérification alcaline. Comme aucune différence de vitesse de dégradation n'a été observée entre le 3-MCPD et le 3-MCPD-¹³C₃, cette quantité est ensuite utilisée pour corriger la surestimation du glycidol issu des esters de glycidol, causée par cette dégradation du 3-MCPD. Dans les conditions appliquées, le 2-MCPD est considéré comme stable et ne contribue donc pas de manière significative à une éventuelle surestimation du glycidol^{[Z][8]}.

Cette méthode permet la quantification simultanée des trois analytes en une seule analyse.

5 Réactifs

5.1 Généralités

AVERTISSEMENT — L'attention du lecteur est attirée sur les règlements qui régissent 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 l'ISO 3696.

5.2 Composés étalons et composés de référence

5.2.1 1,2-Dipalmitoyl-3-chloropropanediol (PP-3-MCPD), pureté \geq 95 %.

NOTE Le 1,2-dipalmitoyl-3-chloropropanediol peut être remplacé par le 1,2-dioléyl-3-chloropropanediol ou d'autres diesters d'acide gras du 3-MCPD de longueur de chaîne similaire (les C16 à C18 sont préférés, car ils sont les plus abondants dans la plupart des corps gras).

5.2.2 1,3-Distéaroyl-2-chloropropanediol (SS-2-MCPD), pureté \geq 95 %.

NOTE Par analogie avec les recommandations fournies pour le PP-3-MCPD, le 1,3-distéaroyl-2-chloropropanediol peut être remplacé par d'autres diesters d'acide gras du 2-MCPD de longueur de chaîne similaire (les C16 à C18 sont préférés, car ils sont les plus abondants dans la plupart des corps gras).

5.2.3 1,2-Dipalmitoyl-3-chloropropanediol marqué au carbone 13 (PP-3-MCPD- $^{13}\text{C}_3$), pureté \geq 95 %.

NOTE La même considération que celle appliquée au 1,2-dipalmitoyl-3-chloropropanediol est également valable pour son analogue marqué au carbone 13; voir Note en 5.2.1.

5.2.4 Stéarate de glycidyle (Gly-S), pureté \geq 98 %.

NOTE Le stéarate de glycidyle peut être remplacé par l'oléate de glycidyle ou d'autres esters d'acide gras du glycidol de longueur de chaîne similaire (les C16 à C18 sont préférés, car ils sont les plus abondants dans la plupart des corps gras).

5.2.5 Stéarate de glycidyle pentadeutééré (Gly-S-d5), pureté \geq 98 %.

NOTE La même considération que celle appliquée au palmitate de glycidyle est également valable pour son analogue pentadeutééré; voir Note en 5.2.4.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/376a0f3d-ce9f-4dc1-b608-ccc5ba1a674d/iso-18363-4-2021>

5.3 Solutions étalons

5.3.1 Généralités

Toutes les solutions étalons sont préparées avec du toluène (5.4.4). Tous les étalons sont préparés en utilisant des composés d'ester de référence (5.2). Les concentrations sont indiquées dans la concentration équivalente en composants libres et elles doivent être corrigées en fonction de la pureté des composés de référence (5.2). Pour un exemple de calcul de conversion de la concentration des esters en concentration équivalente libre, voir 10.2.

5.3.2 Solutions mères

NOTE Les solutions mères sont stables pendant au moins 12 mois en étant conservées à -18 °C. L'utilisation d'un bain à ultrasons peut aider à garantir que tous les étalons sont entièrement dissous.

5.3.2.1 Solution mère d'étalonnage (3-MCPD: 52,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, glycidol: 52,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2-MCPD: 48,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Peser 14,0 mg de PP-3-MCPD (5.2.1), 12,0 mg de Gly-S (5.2.4) et 14,0 mg de SS-2-MCPD (5.2.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Compléter jusqu'au trait, en s'assurant que les étalons sont totalement dissous dans le solvant.

5.3.2.2 Solution mère de dopage (3-MCPD: 52,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, glycidol: 52,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2-MCPD: 34,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Peser 14,0 mg de PP-3-MCPD (5.2.1), 12,0 mg de Gly-S (5.2.4) et 10,0 mg de SS-2-MCPD (5.2.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Compléter jusqu'au trait, en s'assurant que les étalons sont totalement dissous dans le solvant.

5.3.2.3 Solution mère de PP-3-MCPD-¹³C₃ (3-MCPD-¹³C₃: 38,5 µg/ml). Peser 20 mg de PP-3-MCPD-¹³C₃ (5.2.3) dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter jusqu'au trait, en s'assurant que l'étalon est totalement dissous dans le solvant.

5.3.2.4 Solution mère de Gly-S-d5 (Glycidol-d5: 45,8 µg/ml). Peser 10 mg de Gly-S-d5 (5.2.5) dans une fiole jaugée de 50 ml. Compléter jusqu'au trait, en s'assurant que l'étalon est totalement dissous dans le solvant.

5.3.3 Solutions de travail

Il est recommandé de préparer les solutions de travail d'étalonnage le jour où elles sont à utiliser.

Les concentrations de toutes les solutions mères et étalons doivent être corrigées en fonction de la pureté des étalons utilisés.

NOTE La solution de dopage (5.3.3.4) et la solution étalon interne (5.3.3.5) peuvent se conserver au réfrigérateur pendant au moins 3 mois.

5.3.3.1 Solution de travail d'étalonnage I (3-MCPD: 7,9 µg/ml, glycidol: 7,8 µg/ml, 2-MCPD: 7,2 µg/ml). Prélever à la pipette 300 µl de solution mère (5.3.2.1) et les introduire dans un flacon pour CPG de 2,5 ml contenant 1 700 µl de toluène (5.4.4), puis homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex.

5.3.3.2 Solution de travail d'étalonnage II (3-MCPD: 3,2 µg/ml, glycidol: 3,1 µg/ml, 2-MCPD: 2,9 µg/ml). Prélever à la pipette 120 µl de solution mère (5.3.2.1) et les introduire dans un flacon pour CPG de 2,5 ml contenant 1 880 µl de toluène (5.4.4), puis homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex.

5.3.3.3 Solution de travail d'étalonnage III (3-MCPD: 0,16 µg/ml, glycidol: 0,16 µg/ml, 2-MCPD: 0,14 µg/ml). Prélever à la pipette 40 µl de la solution de travail d'étalonnage I (5.3.3.1) et les introduire dans un flacon pour CPG de 2,5 ml contenant 1 960 µl de toluène (5.4.4), puis homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex.

5.3.3.4 Solution de dopage (3-MCPD: 1,05 µg/ml, glycidol: 1,04 µg/ml, 2-MCPD: 0,69 µg/ml). Prélever à la pipette 5,0 ml de la solution mère de dopage (5.3.2.2), les introduire dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter jusqu'au trait avec le solvant.

5.3.3.5 Solution étalon interne (3-MCPD-¹³C₃: 1,54 µg/ml, glycidol-d5: 0,92 µg/ml). Prélever à la pipette 5,0 ml de la solution de Gly-S-d5 (5.3.2.4) et 10,0 ml de solution de PP-3-MCPD-¹³C₃ (5.3.2.3), les introduire dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter jusqu'au trait avec le solvant.

5.4 Autres réactifs

5.4.1 Méthanol, de qualité analytique.

5.4.2 Iso-octane, de qualité analytique.

5.4.3 Acétone, de qualité analytique.

5.4.4 Toluène, de qualité analytique.

5.4.5 Tert-butyl-méthyl-éther, de qualité analytique.

5.4.6 Eau, ultrapure.

5.4.7 Acide sulfurique (pureté ≥ 95 %).

5.4.8 Acide phénylboronique (pureté ≥ 97 %).

5.4.9 Bromure de sodium (pureté $\geq 99,5$ %).

5.4.10 Solution de méthylate de sodium dans du méthanol (fraction massique de 25 %).

5.4.11 Huile végétale pressée à froid, sans traitement thermique (blanc d'huile, voir [9.4](#)).

5.5 Solutions de réactifs

5.5.1 Solution aqueuse d'acide sulfurique (25 %). Transférer 25 ml d'acide sulfurique ([5.4.7](#)) dans une fiole jaugée de 100 ml contenant 50 ml d'H₂O ([5.4.6](#)). Compléter avec de l'H₂O ([5.4.6](#)) jusqu'au trait et homogénéiser.

5.5.2 Solution aqueuse acidifiée de bromure de sodium (bromure de sodium 600 mg/ml, acide sulfurique à une fraction volumique de 0,9 %). Dissoudre 600 g de bromure de sodium ([5.4.9](#)) dans 700 ml d'eau ultrapure ([5.4.6](#)). Transférer la solution de bromure de sodium dans une fiole jaugée de 1 000 ml contenant 36 ml de solution d'acide sulfurique ([5.5.1](#)). Compléter avec de l'H₂O ([5.4.6](#)) jusqu'au trait et homogénéiser.

5.5.3 Solution de méthylate de sodium (0,35 M). Transférer 20 ml de méthylate de sodium (fraction massique de 25 %) ([5.4.10](#)) dans une fiole jaugée de 250 ml, compléter jusqu'au trait avec du méthanol ([5.4.1](#)) et homogénéiser.

NOTE La solution de méthylate de sodium (0,35 M) peut se conserver au réfrigérateur pendant au moins trois mois.

5.5.4 Solution d'acide phénylboronique (saturée) Peser 12,0 g d'acide phénylboronique ([5.4.8](#)) et ajouter 100 ml d'un mélange d'eau à une fraction volumique de 5 % ([5.4.6](#)) dans l'acétone ([5.4.3](#)). Agiter vigoureusement.

NOTE L'acide phénylboronique ne se dissout pas totalement dans le mélange de solvants. Seul le surnageant est employé pour l'étape de dérivation (voir [8.1.11](#)). La solution peut se conserver pendant au moins trois mois à température ambiante.

6 Appareillage

6.1 Agitateur de type vortex

6.2 Porte-échantillon refroidi à $10\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

6.3 Porte-échantillon chauffé à $80\text{ °C} \pm 4,0\text{ °C}$ avec fonction d'agitateur.

6.4 Bain à ultrasons

6.5 Système CPG-SM/SM avec injecteur avec division/sans division (split/splitless) et option de rétrobalayage.

6.6 Colonne de CPG en silice fondue, phase stationnaire 5 % diphényle à 95 % diméthylpolysiloxane ou de polarité similaire, longueur 20 m, diamètre interne 0,18 mm, épaisseur du film 0,18 μm . Précolonne:

phase stationnaire 5 % diphényle à 95 % diméthylpolysiloxane ou de polarité similaire, longueur 2 m, diamètre interne 0,53 mm, épaisseur du film 0,10 µm.

La précolonne est régulièrement remplacée pour conserver une forme de pic et une sensibilité appropriées.

6.7 Pipette électronique, capable de pipeter des volumes allant de 1,0 µl à 1 000 µl.

L'utilisation d'une pipette électronique est recommandée pour l'ajout successif de volumes exacts de solutions étalons internes ou la dilution d'étalons pour étalonnage.

7 Transport et stockage

7.1 Échantillonnage

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

7.2 Préparation de l'échantillon pour essai

Les échantillons liquides doivent être utilisés sans traitement supplémentaire. Les matières grasses solides ou présentant un trouble doivent être placées avec précaution dans une étuve ou un bain-marie à environ 60 °C jusqu'à fusion. Pour les matières grasses ayant un point de fusion élevé, la température doit être augmentée avec précaution par palier de 10 °C jusqu'à déclenchement du processus de fusion. Les échantillons ayant une forte teneur en eau doivent être séchés avant l'échantillonnage (par exemple, à l'aide de Na₂SO₄ anhydre).

Les corps gras dont le point de fusion est supérieur à 60 °C se solidifient souvent lorsqu'ils sont incubés à 10 °C en présence du milieu réactionnel (voir 8.1.4). Cela influence la complétude du clivage des esters, car la vitesse de réaction diminue considérablement. Il est important que les matières grasses à haut point de fusion forment une solution laiteuse pour que la réaction se poursuive. Les échantillons qui se solidifient complètement présentent généralement des signaux de faible intensité et les résultats ne sont pas reproductibles. Les signaux des étalons internes sont des marqueurs efficaces pour repérer les échantillons qui n'ont pas entièrement subi la réaction de clivage. Si les signaux des étalons internes de l'échantillon sont < 50 % des signaux moyens des étalons internes des échantillons de récupération, la préparation de l'échantillon doit être recommencée avec une plus petite quantité de corps gras.

7.3 Conditions de conservation

La concentration en esters de glycidol est influencée par les conditions de conservation, alors que ce n'est pas le cas des esters de MCPD. Il a été démontré que la température ambiante (22 °C) offre la meilleure stabilité pour les esters de glycidol et de MCPD et il convient donc de conserver les échantillons dans ces conditions. Les échantillons ne peuvent pas être conservés dans des conditions réfrigérées (4 °C), car la dégradation des esters de glycidol est susceptible de se produire avec le temps.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon pour essai

NOTE Les modes opératoires sont indiqués pour un seul échantillon. Les temps nécessaires pour la préparation en parallèle d'un lot de 20 échantillons pour les étapes 8.1.5 et 8.1.6 sont donnés dans le Tableau A.2.

8.1.1 Peser de 100 mg à 120 mg d'échantillon de corps gras (avec une fidélité de 0,01 mg) dans un flacon pour CPG de 2,5 ml. Pour les graisses et les matrices d'huile avec des points de fusion > 60 °C, une quantité maximale de 100 mg est pesée afin de prévenir la solidification du mélange réactionnel durant la transestérification (voir 10.1).