



**Norme  
internationale**

**ISO 12966-4**

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

**Partie 4:  
Détermination par  
chromatographie capillaire en  
phase gazeuse**

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

*Part 4: Determination by capillary gas chromatography*

**Deuxième édition  
2026-03**

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)



## DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2026

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](https://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

	Page
Avant-propos .....	v
Introduction .....	vii
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Réactifs et matériaux</b> .....	<b>2</b>
5.1    Étalons de référence .....	2
5.1.1    EMAG de référence .....	2
5.1.2    Corps gras ayant une composition certifiée en acides gras .....	3
5.1.3    Mélange étalon quantitatif d'EMAG contenant des EMAG <i>cis</i> et <i>trans</i> de C4:0 à C22:6 .....	3
5.1.4    Solution étalon d'étalonnage d'EMAG à 2 mg/ml pour le calcul des facteurs de correction .....	3
5.2    Étalons internes .....	3
5.3    Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane) .....	5
5.4    Méthyl tert-butyl éther (MTBE) (2-méthoxy-2-méthylpropane) .....	5
5.5 <i>n</i> -Hexane .....	5
5.6 <i>n</i> -Heptane .....	5
5.7    Solution qualitative de mélange étalon d'isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> .....	5
5.8    Dichlorométhane (chlorure de méthylène) .....	5
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>6</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>6</b>
<b>9</b> <b>Préparation des esters méthyliques de corps gras et d'acides gras</b> .....	<b>6</b>
<b>10</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>6</b>
10.1    Généralités .....	7
10.2    Conditions de chromatographie en phase gazeuse .....	7
10.3    Contrôle des performances .....	7
<b>11</b> <b>Calculs</b> .....	<b>8</b>
11.1    Analyse qualitative et identification des pics .....	8
11.2    Analyse quantitative .....	8
11.2.1    Généralités .....	8
11.2.2    Quantification des EMAG, en masse (g/100 g) .....	10
11.2.3    Quantification des EMAG, en % en aire .....	10
11.2.4    Quantification des esters méthyliques d'acide butyrique et d'acide caproïque (uniquement), en masse (g/100 g) dans le corps gras contenant des acides gras à chaîne courte .....	10
11.2.5    Quantification des EMAG <i>trans</i> totaux (uniquement), en masse (g/100 g) .....	11
11.3    Expression des résultats pour l'étiquetage des denrées alimentaires .....	11
<b>12</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>12</b>
12.1    Résultats d'un essai interlaboratoires .....	12
12.2    Répétabilité .....	12
12.3    Reproductibilité .....	12
<b>13</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe A (informative) Facteur de correction théorique du détecteur à ionisation de flamme pour les esters méthyliques d'acides gras</b> .....	<b>13</b>
<b>Annexe B (informative) Exemples de chromatogrammes</b> .....	<b>16</b>

<b>Annexe C (informative) Zone d'élution des esters méthyliques d'acides gras <i>trans</i></b> .....	<b>23</b>
<b>Annexe D (informative) Facteurs stœchiométriques pour la conversion des esters méthyliques d'acides gras en acides gras</b> .....	<b>28</b>
<b>Annexe E (informative) Détermination de la composition en esters méthyliques d'acides gras exprimée en % en aire des huiles végétales liquides</b> .....	<b>30</b>
<b>Annexe F (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires</b> .....	<b>32</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>42</b>

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)

## 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](http://www.iso.org/directives)).

L'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de brevet revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets). L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

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](http://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).

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 12966-4:2015), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- élargissement du domaine d'application à la séparation des esters méthyliques d'acides gras de C4 à C24;
- élargissement du domaine d'application aux matières grasses de ruminants;
- ajout de la quantification en aire (%) ou en masse (g/100 g) à l'aide d'étalons internes et de facteurs de correction calculés à partir d'un mélange étalon quantitatif d'esters méthyliques d'acides gras contenant des esters méthyliques d'acides gras *cis* et *trans* de C4:0 à C22:6;
- ajout de la quantification des esters méthyliques d'acides gras *trans* totaux en masse (g/100 g);
- précision sur la nécessité d'utiliser désormais des colonnes de 100 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,20 µm d'épaisseur de film pour séparer la plupart des isomères *trans* et *cis* de C18:1;
- ajout d'une méthode de détermination de la composition en esters méthyliques d'acides gras exprimée en % en aire des huiles végétales liquides.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 12966 se trouve sur le site web de l'ISO.

## ISO 12966-4:2026(fr)

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](http://www.iso.org/fr/members.html).

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)

## Introduction

Le présent document est une partie d'une série de quatre Normes internationales relatives à la préparation et à la détermination des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) par chromatographie en phase gazeuse dans les corps gras d'origines animale et végétale. La série ISO 12966 s'applique aux corps gras et acides gras bruts, raffinés, partiellement hydrogénés ou totalement hydrogénés d'origines animale et végétale et aux corps gras extraits de produits alimentaires.

La série ISO 12966 ne convient pas au lait et aux produits laitiers (ou à la matière grasse provenant du lait et des produits laitiers), ni aux produits supplémentés en acide linoléique conjugué (ALC). En outre, elle n'est pas destinée à être appliquée aux corps gras polymérisés et oxydés.

Le présent document donne les conditions pour l'analyse des EMAG par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, tandis que l'ISO 12966-2 et l'ISO 12966-3 couvrent la préparation des EMAG par différentes méthodes. L'ISO 12966-1 est une ligne directrice relative à la chromatographie en phase gazeuse moderne des EMAG.

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)

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

## Partie 4: Détermination par chromatographie capillaire en phase gazeuse

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) obtenus par transestérification ou estérification de corps gras et d'acide gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire. Les EMAG de C4 à C24 peuvent être séparés en utilisant le présent document, y compris les EMAG saturés, les EMAG mono-insaturés *cis* et *trans* et les EMAG poly-insaturés *cis* et *trans*.

Le présent document s'applique aux corps gras et acides gras bruts, raffinés, partiellement hydrogénés ou totalement hydrogénés d'origines animale et végétale et aux corps gras extraits de produits alimentaires.

Le présent document ne s'applique pas au lait et aux produits laitiers (ou à la matière grasse provenant du lait et des produits laitiers), ni aux produits supplémentés en acide linoléique conjugué (ALC).

Le présent document ne s'applique pas aux acides gras et corps gras dimérisés, trimérisés, polymérisés, hydroxylés et oxydés.

Une méthode de détermination de la composition en EMAG exprimée en % en aire des huiles végétales liquides est présentée à l'[Annexe E](#).

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

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

ISO 6353-2, *Réactifs pour analyse chimique — Partie 2: Spécifications — Première série*

ISO 6353-3, *Réactifs pour analyse chimique — Partie 3: Spécifications — Deuxième série*

ISO 12966-2:2017, *Corps gras d'origines animale et végétale — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras — Partie 2: Préparation des esters méthyliques d'acides gras*

ISO 12966-3, *Corps gras d'origines animale et végétale — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras — Partie 3: Préparation des esters méthyliques à l'aide d'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH)*

### 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:

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

## 4 Principe

En utilisant la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, les EMAG sont séparés sur une phase stationnaire de polarité élevée, en fonction de la longueur de leur chaîne, de leur degré de (in) saturation ainsi que de la géométrie et de la position des doubles liaisons. Les pics d'esters méthyliques d'acides gras sont identifiés par comparaison avec le temps de rétention des étalons purs et quantifiés par référence aux étalons internes et aux facteurs de correction de l'instrument.

## 5 Réactifs et matériaux

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs spécifiés dans l'ISO 6353-2 et l'ISO 6353-3 (s'ils y sont énumérés). Sinon, utiliser des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau de qualité 3 au minimum, telle que définie dans l'ISO 3696.

**AVERTISSEMENT** — L'attention des lecteurs est attirée sur les règles qui régissent la manipulation des produits dangereux. Les mesures de sécurité sur les plans technique, organisationnel et du personnel doivent être suivies.

### 5.1 Étalons de référence

#### 5.1.1 EMAG de référence

Esters méthyliques d'acides gras purs, en particulier isomères *cis* et *trans* de l'acide octadécénoïque (oléique), isomères *trans* des acides octadécadiénoïque (linoléique) et octadécatriénoïque ( $\alpha$ -linoléique). Une vaste gamme d'isomères *cis* et *trans* d'esters méthyliques est disponible sur le marché. Les produits suivants sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché.

**5.1.1.1 Esters méthyliques d'acide octadécénoïque**, mélange d'isomères *cis* et *trans* de C18:1 avec acide *trans*-4 à *trans*-16 octadécénoïque (tous les isomères) et principaux isomères *cis*. Concentration de 2,5 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) ou du dichlorométhane (5.8).

NOTE Cet étalon est disponible sur le marché auprès de Supelco Inc, marque de Sigma-Aldrich (Cat. 40495-U).

**5.1.1.2 Esters méthyliques d'acide linoléique**, mélange d'isomères *cis* et *trans* de C18:2 avec acide *trans*-9,*trans*-12-octadécadiénoïque (environ 50 %), acide *cis*-9,*trans*-12-octadécadiénoïque (environ 20 %), acide *trans*-9,*cis*-12-octadécadiénoïque (environ 20 %) et acide *cis*-9,*cis*-12-octadécadiénoïque (environ 10 %). Concentration de 10 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) ou du dichlorométhane (5.8).

NOTE Cet étalon est disponible sur le marché auprès de Supelco Inc, marque de Sigma-Aldrich (Cat. 47791)<sup>1</sup>.

**5.1.1.3 Esters méthyliques d'acide linoléique, mélange d'isomères *cis* et *trans* de C18:3** avec:

- ester méthylique d'acide *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 3 %);

---

1) Le produit de Supelco Inc., marque de Sigma Aldrich, est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'IDF ou l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

- ester méthylique d'acide *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 7 %);
- ester méthylique d'acide *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 7 %);
- ester méthylique d'acide *cis*-9,*trans*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 15 %);
- ester méthylique d'acide *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 7 %);
- ester méthylique d'acide *trans*-9,*cis*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 15 %);
- ester méthylique d'acide *trans*-9,*trans*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 15 %);
- ester méthylique d'acide *trans*-9,*trans*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (fraction massique d'environ 30 %).

Concentration de 10 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) ou du dichlorométhane (5.8).

NOTE Cet étalon est disponible sur le marché auprès de Supelco Inc, marque de Sigma-Aldrich (Cat. 47792)<sup>1)</sup>. Cet étalon contient tous les isomères *trans* de C18:3 (huit au total), mais leur abondance et leur rapport sont différents de ceux observés dans les corps gras raffinés/désodorisés.

**5.1.1.4 Acides conjugués d'octadécadiénoate de méthyle (ALC)**, mélange d'acides conjugués C18:2 *cis*-9,*trans*-11 et *cis*-10,*trans*-12-octadécadiénoate, d'une pureté ≥ 99 % en fraction massique.

NOTE Cet étalon est disponible sur le marché auprès de Supelco Inc, marque de Sigma-Aldrich (Cat. 05507)<sup>1)</sup>. Cet étalon contient les deux principaux isomères d'ALC, mais le rapport des isomères peut varier d'un lot à l'autre.

## 5.1.2 Corps gras ayant une composition certifiée en acides gras

Corps gras ayant une composition certifiée en acides gras (par exemple matériaux de référence externes ou matériau de référence certifié). Ce type d'échantillon est accompagné d'un certificat qui fournit les valeurs moyennes et l'incertitude associée pour chaque acide gras. Ces produits sont souvent, par exemple, disponibles sur le marché dans le cadre de programmes d'essais d'aptitude (BIPEA, AOCS, FAPAS, JRC, etc.).

## 5.1.3 Mélange étalon quantitatif d'EMAG contenant des EMAG *cis* et *trans* de C4:0 à C22:6

Ce type de mélange d'EMAG est disponible sur le marché<sup>2)</sup>. Il est également possible de préparer le mélange étalon d'EMAG à partir d'étalons d'EMAG individuels et purs, mais les étalons d'EMAG individuels sont plus coûteux et la préparation prend du temps et exige une grande précision.

Il est nécessaire de connaître la quantité de chaque étalon d'EMAG présent dans le mélange pour déterminer le facteur de correction (aire/quantité) pour chaque EMAG (voir Figure B.1).

## 5.1.4 Solution étalon d'étalonnage d'EMAG à 2 mg/ml pour le calcul des facteurs de correction

Laisser le mélange étalon quantitatif d'EMAG (5.1.3) atteindre la température ambiante à l'obscurité sans chauffage. À l'aide d'une pipette Pasteur, transférer rapidement le contenu du flacon dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter au volume avec de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5). Diluer en fonction du type d'injecteur utilisé.

## 5.2 Étalons internes

Pour la quantification des acides gras, en grammes pour 100 g, il faut utiliser un EMAG comme étalon interne.

2) Exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Nu-Check-Prep, Cat. n° GLC 36 ou GLC 37 (avec EMAG C23:0). Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

S'il est nécessaire de vérifier le taux de récupération et l'efficacité de la méthode de dérivation, il convient alors d'utiliser les deux étalons internes triacylglycérol (TAG) et EMAG, ou l'un des deux. Alors que l'étalon interne TAG-EI est ajouté à l'échantillon avant la préparation des EMAG, l'étalon interne EMAG-EI est ajouté avant ou après la préparation des EMAG. L'EMAG-EI est utilisé pour calculer le taux de récupération de l'EMAG à partir du TAG-EI et, par conséquent, l'efficacité de la procédure de dérivation. Dans ce cas, les étalons doivent avoir une longueur de chaîne différente.

Pour la quantification de tous les acides gras dans les huiles végétales, les graisses animales ou les corps gras extraits, l'étalon interne recommandé est l'EMAG C21:0 ou l'EMAG C19:0, en fonction des coélutions possibles, telles que celle de C21:0/C18:2 conjugués.

Pour la quantification de tous les acides gras dans l'huile de poisson, l'étalon interne recommandé est l'EMAG C23:0.

Pour la quantification de l'acide butyrique (C4:0) et de l'acide caproïque (C6:0) uniquement dans les corps gras contenant des acides gras à chaîne courte, l'étalon interne recommandé est l'EMAG C5:0.

Pour la quantification des acides gras *trans* uniquement, dans les huiles végétales, les graisses animales ou les corps gras extraits, l'étalon interne recommandé est l'EMAG C19:0. Il convient d'adapter la concentration de l'étalon interne à la teneur attendue en acides gras *trans*.

Selon la colonne capillaire et le gaz vecteur utilisés, les coélutions peuvent être différentes. Il est recommandé d'effectuer une analyse supplémentaire de l'échantillon sans ajouter l'étalon interne afin de vérifier la teneur naturelle en acide gras qui est utilisé comme étalon interne (C19:0 ou C21:0 ou C23:0). La teneur doit être prise en compte dans le calcul.

Les solutions d'étalon interne sont stables si des précautions sont prises pour éviter la perte de solvant, et donc une variation de la concentration de l'EI. Par exemple, conserver la solution au réfrigérateur dans une bouteille ambrée étanche lorsqu'elle n'est pas utilisée. Des étalons purs sont disponibles sur le marché. La pureté de l'étalon interne doit être confirmée par une analyse par chromatographie sur couche mince, chromatographie en phase liquide à haute performance, chromatographie en phase gazeuse ou par toute autre technique appropriée.

Les solutions suivantes sont des exemples de solutions étalons appropriées:

- Une solution d'étalon interne d'EMAG C5:0: ester méthylique d'acide valérique (pureté  $\geq 99$  % en fraction massique), d'une concentration massique de 0,5 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4), ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) peut être utilisée comme étalon interne.
- Une solution d'étalon interne d'EMAG C19:0: ester méthylique d'acide nonadécanoïque (pureté  $\geq 99$  % en fraction massique), d'une concentration massique de 5 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) peut être utilisée comme étalon interne.
- Une solution d'étalon interne d'EMAG C21:0: ester méthylique d'acide hénéicosanoïque (pureté  $\geq 99$  % en fraction massique), d'une concentration massique de 5 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) peut être utilisée comme étalon interne.
- Une solution d'étalon interne d'EMAG C23:0: ester méthylique d'acide tricosanoïque (pureté  $\geq 99$  % en fraction massique), d'une concentration massique de 5 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) peut être utilisée comme étalon interne.

Afin de vérifier le taux de récupération et l'efficacité de la méthode de dérivation, la solution étalon appropriée est la suivante:

- Une solution d'étalon interne de TAG C13:0: tritridécanoïne (pureté  $> 99$  % en fraction massique), d'une concentration massique de 5 mg/ml dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5) peut être utilisée comme étalon interne.

Si le TAG-EI est difficile à dissoudre à froid, une méthode de méthylation à chaud, comme spécifié dans l'ISO 12966-2:2017, 4.3, 4.4 et 4.5, doit être utilisée.

### 5.3 Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane)

### 5.4 Méthyl tert-butyl éther (MTBE) (2-méthoxy-2-méthylpropane)

### 5.5 *n*-Hexane

### 5.6 *n*-Heptane

### 5.7 Solution qualitative de mélange étalon d'isomères *cis* et *trans*

Pour l'identification du temps de rétention (TR) des isomères *cis* et *trans* (c'est-à-dire C18:1, C18:2, C18:3 et ALC), préparer une solution étalon qualitative avec les étalons énumérés de [5.1.1.1](#) à [5.1.1.4](#). Tous les étalons disponibles sur le marché peuvent être utilisés. Dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter chaque solution étalon d'isomère en proportion égale. Dissoudre et compléter jusqu'au trait avec de l'iso-octane ([5.3](#)) ou du MTBE ([5.4](#)) ou du *n*-heptane ([5.6](#)) ou du *n*-hexane ([5.5](#)). Diluer en fonction du type d'injecteur utilisé.

Il est également possible d'identifier les temps de rétention des isomères *cis* et *trans* à l'aide d'une matière grasse ou d'une huile dont la composition en acides gras est certifiée ([5.1.2](#)), par exemple des échantillons d'huile hydrogénée de référence.

### 5.8 Dichlorométhane (chlorure de méthylène)

## 6 Appareillage

L'équipement courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit doit être utilisé.

**6.1 Appareil de chromatographie en phase gazeuse**, muni d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un dispositif d'injection avec ou sans division et d'un système d'acquisition de données.

NOTE Il est également possible d'utiliser des dispositifs d'injection directe dans la colonne et des vaporisateurs à température programmée (PTV).

**6.2 Colonne capillaire**, capillaire en silice fondue de 100 m de longueur et 0,25 mm de diamètre intérieur, revêtu d'une phase stationnaire constituée de cyanopropyl-polysiloxane, telle que SP-2560 ou CP-Sil 88<sup>3)</sup>, d'une épaisseur de 0,20 µm. Des colonnes préparées sont disponibles sur le marché auprès de différents fournisseurs.

Il est requis d'utiliser des colonnes de 100 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur, 0,20 µm d'épaisseur de film avec comme phase stationnaire SP-2560 ou CP-Sil 88, car la capacité de séparation de ces colonnes est suffisante pour séparer la plupart des isomères *trans* et *cis* de C18:1 et est conforme à la spécification de résolution indiquée en [10.3](#). Si cette séparation n'est pas requise, une colonne de 50 m ou de 60 m peut également être utilisée. Toutefois, il est également possible que certaines colonnes de 50 m ou 60 m de longueur puissent également obtenir cette séparation, essentiellement pour des huiles d'origine végétale. D'autres types de colonnes (BPX70, DB-23, HP-23, Rtx-2330, SP-2330, SP-2380, etc.) peuvent également être utilisés, mais un décalage de l'ordre d'éluion est possible. Pour une analyse rapide par chromatographie en phase gazeuse, il est également possible d'utiliser des colonnes courtes (10 m à 15 m), mais avec des informations limitées qui, dans certains cas, ne constitueront pas un problème.

**6.3 Microseringue**, pour chromatographie en phase gazeuse, contenance 10 µl, avec aiguille en acier trempé.

---

3) Exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

**6.4 Gaz vecteur**, hydrogène (recommandé), azote ou hélium, pureté 99,999 5 % ou supérieure, de qualité pour chromatographie en phase gazeuse, sec et privé d'oxygène à l'aide de filtres appropriés (<0,1 mg/kg), exempt d'impuretés organiques.

**AVERTISSEMENT** — L'hydrogène, utilisé avec les colonnes capillaires, permet de doubler la vitesse d'analyse (par rapport à l'hélium), mais il est dangereux. Il existe cependant des générateurs d'hydrogène et des dispositifs de sécurité et il est indispensable d'incorporer un dispositif approprié dans l'appareil.

**6.5 Gaz de flamme**, hydrogène et air, de qualité pour chromatographie en phase gazeuse, exempts d'impuretés organiques.

**6.6 Gaz d'entraînement**, azote ou hélium, de qualité pour chromatographie en phase gazeuse, exempt d'impuretés organiques.

## 7 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif soit transmis au laboratoire. Il convient qu'il ne soit pas endommagé ou modifié pendant le transport ou la conservation.

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

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 661.

## 9 Préparation des esters méthyliques de corps gras et d'acides gras

Les EMAG doivent être préparés conformément à l'ISO 12966-2 ou à l'ISO 12966-3. L'utilisation de l'ISO 12966-3 n'est pas recommandée pour la quantification en masse des EMAG (g/100 g) car seuls 70 % à 80 % des acides gras libres sont estérifiés et cette préparation peut conduire à une isomérisation des acides gras insaturés tels que les acides conjugués d'octadécadiénoate de méthyle (ALC).

Avant la méthylation, la solution d'étalon interne est introduite dans la fiole de réaction de manière à obtenir, après l'addition du corps gras, une fraction massique comprise entre 0,01 mg et 0,20 mg d'étalon interne/mg de corps gras.

Par exemple, 2 ml de solution étalon interne (5.2) peuvent être ajoutés à une prise d'essai de 100 mg de corps gras avant méthylation.

Dissoudre les EMAG préparés dans de l'iso-octane (5.3) ou du MTBE (5.4) ou du *n*-heptane (5.6) ou du *n*-hexane (5.5). Pour une injection avec division, il convient que la concentration massique soit d'environ 15 mg/ml à 20 mg/ml. Pour une injection directe dans la colonne, il convient que la concentration massique soit adaptée.

Il est recommandé d'effectuer une analyse supplémentaire de l'échantillon sans ajouter l'étalon interne afin de vérifier la teneur naturelle en acide gras qui est utilisé comme étalon interne. Cette teneur naturelle doit être prise en compte dans le calcul.

## 10 Mode opératoire

**AVERTISSEMENT** — Compte tenu du caractère toxique de certains solvants, une hotte ventilée doit être utilisée.

## 10.1 Généralités

Le premier échantillon d'un lot d'analyse doit toujours être un solvant de dissolution des EMAG à blanc. Aucun pic ne doit être détecté lors de cet essai à blanc.

## 10.2 Conditions de chromatographie en phase gazeuse

Régler les températures et les conditions de chromatographie en phase gazeuse en tenant compte du type de corps gras ou d'acide gras analysé et de l'appareillage utilisé. Les conditions suivantes se sont révélées appropriées pour la séparation des EMAG (C4 à C24) sur des colonnes de 100 m. Toutefois, d'autres conditions sont également possibles et peuvent être utilisées.

Température de l'injecteur: 250 °C

Température du détecteur: 250 °C

Température du four: 60 °C (2 min) à 172 °C à 30 °C/min, maintien pendant 5 min à 172 °C, 172 °C à 210 °C à 1 °C/min, maintien pendant 22 min à 210 °C

Gaz vecteur (hydrogène): pression en tête de colonne, 150 kPa (pression constante)  
vitesse linéaire: 30 cm/s à 40 cm/s; débit: environ 1,0 ml/min  
rapport de division, 1:25 ou 1:100 selon la dilution

Volume d'injection: 1 µl (équivalent à 15 µg à 20 µg d'EMAG)

Des exemples de chromatogrammes sont donnés à l'[Annexe B](#).

NOTE Pour l'analyse des corps gras d'origine animale, l'élution complète de tous les EMAG peut être contrôlée avec des étalons de référence certifiés.

## 10.3 Contrôle des performances

Les performances de la colonne sont contrôlées à l'aide d'un mélange approprié d'EMAG couvrant la gamme des acides gras étudiés. Étant donné que les modèles d'appareils de CPG du commerce sont différents et que la séparation obtenue n'est pas identique aux exemples de chromatogrammes, de légères modifications de la taille de l'échantillon, de la concentration de l'échantillon ou de la température du four peuvent être nécessaires. Dans ce cas, ajuster la taille de l'échantillon, la concentration de l'échantillon ou la température du four jusqu'à obtention des meilleurs résultats de séparation. Si la température du four pour colonne doit être ajustée, il convient de le faire par petits incréments, de préférence par paliers de 1 °C.

Prêter une attention particulière à la séparation et à l'identification des paires critiques telles que C16:1/C17:0, C18:3n-3/C20:1 et C21:0/C18:2 conjugués.

Pour la quantification précise d'AGT C18:1 (teneur  $\geq 0,3$  g/100 g de corps gras), une résolution suffisante entre C18:1 *trans*-13/14 et C18:1 *cis*-9 (acide oléique) est requise. La résolution est déterminée par injection de la solution qualitative de mélange étalon d'isomères EMAG C18:1 *cis* et *trans* ([5.1.1.1](#)) ou par injection de la solution qualitative de mélange étalon d'isomères *cis* et *trans* ([5.7](#)).

Diluer en fonction du type d'injecteur utilisé. Injecter la solution d'étalonnage ([5.1.1.1](#) ou [5.7](#)) dans le chromatographe en phase gazeuse. Déterminer la largeur du pic à mi-hauteur et la distance entre la gauche