
**Lait, produits laitiers, formules
infantiles et produits nutritionnels
pour adultes — Détermination de
la composition en acides gras —
Méthode de chromatographie en
phase gazeuse sur colonne capillaire**

*Milk, milk products, infant formula and adult nutritionals —
Determination of fatty acids composition — Capillary gas
chromatographic method*

get full document from standards.iteh.ai



Numéros de référence
ISO 16958:2015(F)
FIL 231:2015(F)

© ISO et FIL 2015

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2015, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B • B-1030 Brussels

Tel. + 32 2 325 67 40
Fax + 32 2 325 67 41
info@fil-idf.org
www.fil-idf.org

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	6
7 Échantillonnage	9
8 Préparation de l'échantillon pour essai	9
8.1 Lait liquide, lait en poudre et formule infantile ayant une teneur en matière grasse ≥ 1,5 % m/m	9
8.2 Lait liquide, lait en poudre et formule infantile ayant une teneur en matière grasse < 1,5 % m/m	9
8.3 Fromage	9
9 Mode opératoire	10
9.1 Prise d'essai	10
9.2 Détermination quantitative	11
9.2.1 Détermination des facteurs de réponse.....	11
9.2.2 Détermination de la prise d'essai	11
9.2.3 Identification des acides gras	11
10 Calcul et expression des résultats	13
10.1 Calcul	13
10.1.1 Calcul du facteur de réponse.....	13
10.1.2 Acides gras dans le produit.....	13
10.1.3 Acides gras dans la matière grasse totale.....	14
10.1.4 Somme de la classe ou du groupe d'acides gras dans 100 g de produit.....	14
10.1.5 Somme de la classe ou du groupe d'acides gras dans 100 g de matière grasse	14
10.1.6 Performance de la <i>transestérification</i>	14
10.2 Expression des résultats.....	15
11 Fidélité	15
11.1 Essai interlaboratoires	15
11.2 Répétabilité.....	16
11.3 Reproductibilité	16
11.4 Limite de détection.....	16
11.5 Limite de quantification.....	16
12 Rapport d'essai	16
Annexe A (normative) Groupes ou classes d'acides gras et acides gras individuels	17
Annexe B (informative) Exemples d'analyse par chromatographie gaz-liquide	21
Annexe C (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires	31
Bibliographie	53

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 appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

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

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* et la Fédération Internationale du lait (FIL), en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément, par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans la présente Norme internationale est l'équivalent de la méthode officielle de l'AOAC 2012.13: *Détermination de la teneur en acides gras déclarés dans les produits laitiers et les formules infantiles*.

La FIL (Fédération internationale du lait) est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, incluant des producteurs laitiers, des acteurs de l'industrie de transformation des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement sur toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organisations.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. La FIL 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.

L'ISO 16958|FIL 231 a été élaborée par le comité permanent de la FIL chargé des *Méthodes d'analyse pour la composition* et par le comité technique de l'ISO, l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* (ISO/TC 34/SC 5), en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément, par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans la présente Norme internationale est l'équivalent de la méthode officielle de l'AOAC 2012.13: *Détermination de la teneur en acides gras déclarés dans les produits laitiers et les formules infantiles*.

L'ensemble des travaux a été confié à l'équipe d'action mixte ISO/FIL C11 du comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse pour la composition*, sous la conduite de son chef de projet, M. Pierre-Alain Golay (CH).

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

Lait, produits laitiers, formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la composition en acides gras — Méthode de chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de quantification des acides gras individuels et/ou de tous les acides gras dans le profil du lait, des produits laitiers, des formules infantiles et des préparations nutritionnelles pour adultes contenant de la matière grasse de lait et/ou des huiles végétales, supplémentées ou non supplémentées avec des huiles riches en acides gras polyinsaturés à chaîne longue (AGPI-CL). Cela inclut également les groupes d'acides gras souvent déclarés [c'est-à-dire, les acides gras *trans* (AGT), les acides gras saturés (AGS), les acides gras monoinsaturés (AGMI), les acides gras polyinsaturés (AGPI), les acides gras oméga-3, oméga-6 et oméga-9] et/ou les acides gras individuels [c'est-à-dire l'acide linoléique (AL), l'acide α -linoléique (AAL), l'acide arachidonique (ARA), l'acide éicosapentaénoïque (AEP), l'acide docosahexaénoïque (ADH)].

La détermination est effectuée par *transestérification* directe dans les matrices d'aliments, sans extraction préalable de la matière grasse. Elle s'applique donc aux échantillons liquides ou aux échantillons pulvérulents reconstitués avec de l'eau et ayant une teneur totale en matière grasse supérieure ou égale à 1,5 % (m/m).

La matière grasse extraite de produits contenant moins de 1,5 % (m/m) de matière grasse peut être analysée avec la même méthode après une extraction préalable de la matière grasse en utilisant les méthodes référencées dans l'[Article 2](#). Les produits laitiers tels que les fromages à pâte molle ou à pâte dure ayant un niveau d'acidité inférieur ou égal à 1 mmol/100 g de matière grasse peuvent être analysés après une extraction préalable de la matière grasse en utilisant les méthodes référencées dans l'[Article 2](#). Pour les produits supplémentés ou enrichis en AGPI extrait d'huile de poisson ou d'algues, il convient que l'évaporation de solvants soit effectuée à la plus faible température possible (par exemple, 40 °C maximum) pour récupérer ces acides gras sensibles.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application 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 1042, *Verrerie de laboratoire — Fioles jaugées à un trait*

ISO 1735|FIL 5, *Fromages et fromages fondus — Détermination de la teneur en matière grasse — Méthode gravimétrique (Méthode de référence)*

ISO 1740|FIL 6, *Produits à matière grasse laitière et beurre — Détermination de l'acidité de la matière grasse (Méthode de référence)*

ISO 14156|FIL 172, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'extraction des lipides et des composés liposolubles*

3 Termes et définitions

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

3.1 teneur en acides gras
fraction massique d'une ou plusieurs substances déterminée par le mode opératoire spécifié dans la présente Norme internationale

Note 1 à l'article: Voir le [Tableau A.1](#).

Note 2 à l'article: La teneur en acides gras est exprimée sous forme de fraction massique en grammes (ou en milligrammes) des acides gras pour 100 g de produit (voir le [Tableau A.1](#)). Les résultats des acides gras peuvent être convertis dans d'autres formats d'expression des résultats (voir [10.2](#)).

4 Principe

Ajout de la solution étalon interne à l'échantillon, préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) par *transestérification* directe avec du méthoxyde de sodium méthanolique pour les échantillons liquides; dissolution (c'est-à-dire, reconstitution) dans l'eau pour les échantillons pulvérulents et *transestérification* directe avec du méthoxyde de sodium méthanolique. Le même mode opératoire de *transestérification* est utilisé pour la matière grasse extraite de divers aliments (par exemple, produits pauvres en matière grasse, fromages).

Séparation des EMAG par chromatographie gaz-liquide sur colonne capillaire. Identification des EMAG par comparaison avec le temps de rétention des étalons purs et quantification en tant qu'acides gras en référence à un étalon interne (EMAG C11:0) et aux facteurs de réponse de l'instrument. Vérification de la performance de *transestérification* à l'aide d'un deuxième étalon interne (TAG C13:0).

5 Réactifs

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

5.1 *n*-Hexane, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]$, qualité pour chromatographie.

5.2 Méthanol, $[\text{CH}_3\text{OH}]$, qualité pour chromatographie.

5.3 Eau, qualité pour CLHP ou de pureté équivalente.

5.4 Solution de méthoxyde de sodium $[\text{CH}_3\text{ONa}]$, dissoute dans du méthanol à 30 % m/v ou 25 % m/v, selon la disponibilité locale.

5.5 Solution de *transestérification* (solution de méthoxyde de sodium à 5 % dans du méthanol).

Dans une fiole jaugée de 300 ml, introduire à la pipette 50 ml (ou 60 ml) de solution de méthoxyde de sodium à 30 % m/v (ou 25 % m/v) et mélanger doucement avec 250 ml de méthanol en utilisant un agitateur magnétique. Retirer l'agitateur magnétique puis refroidir à température ambiante et compléter jusqu'au trait avec du méthanol.

Cette solution est stable pendant une semaine si elle est conservée à l'abri de la lumière et à 4 °C. Laisser la solution s'équilibrer à température ambiante avant utilisation. Ce volume de solution permet d'analyser environ 40 échantillons. S'il y a moins d'analyses, le volume de réactif peut être adapté en conséquence.

Effectuer la réaction de *transestérification* à température ambiante (entre 20 °C et 25 °C).

NOTE La valeur indiquée entre parenthèses () correspond à la solution de méthoxyde de sodium à 25 % m/v.

5.6 Hydrogénocitrate de disodium sesquihydraté, $[\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}]$.

5.7 Chlorure de sodium, $[\text{NaCl}]$.

5.8 Solution de neutralisation (hydrogénocitrate de disodium sesquihydraté à 10 %, chlorure de sodium à 15 % m/v dans l'eau).

Peser 50,0 g d'hydrogénocitrate de disodium sesquihydraté et 75,0 g de chlorure de sodium dans une fiole jaugée de 500 ml. Dissoudre dans 450 ml d'eau en utilisant un agitateur magnétique. Retirer l'agitateur magnétique puis compléter jusqu'au trait avec de l'eau.

Cette solution est stable pendant un mois si elle est conservée à l'abri de la lumière et à 4 °C. Des cristaux de sel peuvent apparaître dans la solution pendant la période de stockage, mais ils disparaissent après agitation.

Laisser la solution s'équilibrer à température ambiante avant utilisation. Ce volume de solution permet d'analyser environ 40 échantillons ou plus. S'il y a moins d'analyses (ou une seule analyse), la masse et le volume de solution peuvent être adaptés en conséquence.

5.9 Éther méthylique de tert-butyle (MTBE), qualité pour chromatographie.

5.10 Undécanoate de méthyle (EMAG C11:0), de pureté $\geq 99\%$, en fraction massique.

5.11 Tritridécanoïne (TAG C13:0), de pureté $\geq 99\%$, en fraction massique.

5.12 Solution étalon d'EMAG C11:0/TAG C13:0

Dans une fiole jaugée de 250 ml, peser, à 0,1 mg près, environ 500 mg de tritridécanoïne et 500 mg d'undécanoate de méthyle. Dissoudre et compléter au volume avec du MTBE.

Cette solution est stable pendant une semaine si elle est conservée à l'abri de la lumière et à 4 °C. Laisser la solution s'équilibrer à température ambiante avant utilisation.

Ce volume de solution permet d'analyser environ 40 échantillons ou plus. S'il y a moins d'analyses, la masse et le volume de solvant peuvent être adaptés en conséquence.

5.13 Esters méthyliques d'acide octadécénoïque, mélange d'isomères *cis* et *trans* de C18:1 avec des isomères *trans*-4 à *trans*-16 d'acide octadécénoïque (tous les isomères) et des isomères *cis* principaux. Concentration de 2,5 mg/ml dans du chlorure de méthylène.

NOTE Cet étalon est disponible dans le commerce auprès de Supelco Inc, une marque de Sigma-Aldrich (réf. 40495-U)¹⁾.

5.14 Esters méthyliques d'acide linoléique, mélange d'isomères *cis* et *trans* de C18:2 avec de l'acide *trans*-9,*trans*-12-octadécadiénoïque (~ 50 %), de l'acide *cis*-9,*trans*-12-octadécadiénoïque (~ 20 %), de l'acide *trans*-9,*cis*-12-octadécadiénoïque (~ 20 %) et de l'acide *cis*-9,*cis*-12-octadécadiénoïque (~ 10 %). Concentration de 10 mg/ml dans du chlorure de méthylène.

NOTE Cet étalon est disponible dans le commerce exclusivement auprès de Supelco Inc, une marque de Sigma-Aldrich (réf. 47791)¹⁾.

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

- de l'ester méthylique d'acide *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (~ 3 % m/m),
- de l'ester méthylique d'acide *cis*-9,*cis*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (~ 7 % m/m),
- de l'ester méthylique d'acide *cis*-9,*trans*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (~ 7 % m/m),

1) Supelco Inc., une marque de Sigma Aldrich, est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

- de l'ester méthylique d'acide *cis*-9,*trans*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (~ 15 % m/m),
- de l'ester méthylique d'acide *trans*-9,*cis*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (~ 7 % m/m),
- de l'ester méthylique d'acide *trans*-9,*cis*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (~ 15 % m/m),
- de l'ester méthylique d'acide *trans*-9,*trans*-12,*cis*-15-octadécatriénoïque (~ 15 % m/m) et
- de l'ester méthylique d'acide *trans*-9,*trans*-12,*trans*-15-octadécatriénoïque (~ 30 % m/m).

Concentration de 10 mg/ml dans du chlorure de méthylène.

NOTE Cet étalon est disponible dans le commerce auprès de Supelco Inc, une marque de Sigma-Aldrich (réf. 47792)¹⁾. 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 huiles et les matières grasses raffinées/désodorisées.

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

NOTE Cet étalon est disponible dans le commerce auprès de Supelco Inc, une marque de Sigma-Aldrich (réf. 05507)¹⁾. Cet étalon contient les deux principaux isomères d'ALC, mais le rapport des isomères peut varier d'un lot à l'autre.

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

Pour l'identification du temps de rétention (RT) 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 indiqués de 5.13 à 5.16. Tous les étalons disponibles dans le commerce peuvent être utilisés. Dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter chaque solution étalon d'isomères en proportions égales. Dissoudre et compléter jusqu'au trait avec de l'hexane. Diluer en fonction du type d'injecteur utilisé.

5.18 Solution d'étalons d'EMAG pour étalonnage

5.18.1 Préparation avec des étalons EMAG individuels

5.18.1.1 Étalons EMAG individuels

Acheter les étalons EMAG individuels suivants (pureté ≥ 99 %):

Ester méthylique d'acide butyrique (C4:0), ester méthylique d'acide caproïque (C6:0), ester méthylique d'acide caprylique (C8:0), ester méthylique d'acide caprique (C10:0), ester méthylique d'acide undécanoïque (C11:0), ester méthylique d'acide laurique (C12:0), ester méthylique d'acide tridécanoïque (C13:0), ester méthylique d'acide myristique (C14:0), ester méthylique d'acide myristoléique (C14:1 *cis*-9 ou n-5), ester méthylique d'acide pentadécanoïque (C15:0), ester méthylique d'acide *cis*-10-pentadécénoïque (C15:1 *cis*-10 n-5), ester méthylique d'acide palmitique (C16:0), ester méthylique d'acide palmitoléique (C16:1 *cis*-9 ou n-7), ester méthylique d'acide heptadécanoïque (C17:0), ester méthylique d'acide *cis*-10-heptadécénoïque (C17:1 *cis*-10 ou n-7), ester méthylique d'acide stéarique (C18:0), ester méthylique d'acide élaïdique (C18:1 *trans*-9 ou n-9), ester méthylique d'acide oléique (C18:1 *cis*-9 ou n-9), ester méthylique d'acide linolélaïdique (C18:2 tout *trans*-9,12 ou n-6), ester méthylique d'acide linoléique (C18:2 tout *cis*-9,12 ou n-6), ester méthylique d'acide arachidique (C20:0), ester méthylique d'acide gamma-linoléique (C18:3 tout *cis*-6,9,12 ou n-6), ester méthylique d'acide *cis*-11-éicosénoïque (C20:1 *cis*-11 ou n-9), ester méthylique d'acide linoléique (C18:3 tout *cis*-9,12,15 ou n-3), ester méthylique d'acide hénéicosanoïque (C21:0), ester méthylique d'acide *cis*-11,14-éicosadiénoïque (C20:2 tout *cis*-11,14 ou n-6), ester méthylique d'acide béhénique (C22:0), ester méthylique d'acide *cis*-8,11,14-éicosatriénoïque (C20:3 tout *cis*-8,11,14 ou n-6 *cis*), ester méthylique d'acide érucique (C22:1 *cis*-13 ou n-9), ester méthylique d'acide *cis*-11,14,17-éicosatriénoïque (C20:3 tout *cis*-11,14,17 ou n-3), ester méthylique d'acide arachidonique (C20:4 tout *cis*-5,8,11,14 ou n-6), ester méthylique d'acide *cis*-13,16-docosadiénoïque (C22:2 tout *cis*-13,16 ou n-6), ester méthylique d'acide lignocérique (C24:0), ester méthylique d'acide *cis*-5,8,11,14,17-éicosapentaénoïque (C20:5 tout *cis*-5,8,11,14,17 ou n-3), ester

méthylque d'acide nervonique (C24:1 *cis*-15 ou *n*-9), ester méthylque d'acide *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque (C22:6 tout *cis*-4,7,10,13,16,19 ou *n*-3).

NOTE Il revient plus cher d'acheter des étalons EMAG individuels qu'un seul mélange étalon d'EMAG. De plus, le fait de peser chaque étalon EMAG individuellement peut engendrer des imprécisions et nécessite une haute précision de pesée.

5.18.1.2 Solution mère 1 — Saturée

Dans une fiole jaugée de 100 ml, peser à 0,1 mg près, environ 25 mg d'ester méthylque d'acide lignocérique (C24:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide béhénique (C22:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide hénicosanoïque (C21:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide arachidique (C20:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide stéarique (C18:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide heptadécanoïque (C17:0), 50 mg d'ester méthylque d'acide palmitique (C16:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide pentadécanoïque (C15:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide myristique (C14:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide tridécanoïque (C13:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide laurique (C12:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide undécanoïque (C11:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide caprique (C10:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide caprylique (C8:0), 25 mg d'ester méthylque d'acide caproïque (C6:0) et 25 mg d'ester méthylque d'acide butyrique (C4:0). Compléter jusqu'au trait avec du *n*-hexane.

L'acide palmitique est pesé en double quantité. Les esters méthylques d'acides gras à chaîne courte (c'est-à-dire, C4:0, C6:0 et C8:0) sont volatils et doivent être pesés à la fin du mode opératoire.

5.18.1.3 Solution mère 2 — Monoinsaturée

Dans une fiole jaugée de 100 ml, peser à 0,1 mg près, environ 25 mg d'ester méthylque d'acide nervonique (C24:1 *cis*-15 ou *n*-9), 25 mg d'ester méthylque d'acide érucique (C22:1 *cis*-13 ou *n*-9), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-11-éicosénoïque (C20:1 *cis*-11 ou *n*-9), 25 mg d'ester méthylque d'acide oléique (C18:1 *cis*-9 ou *n*-9), 25 mg d'ester méthylque d'acide élaïdique (C18:1 *trans*-9 ou *n*-9 *trans*), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-10-heptadécénoïque (C17:1 *cis*-10 ou *n*-7), 25 mg d'ester méthylque d'acide palmitoléique (C16:1 *cis*-9 ou *n*-7), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-10-pentadécénoïque (C15:1 *cis*-10 ou *n*-5) et 25 mg d'ester méthylque d'acide myristoléique (C14:1 *cis*-9 ou *n*-5). Compléter jusqu'au trait avec du *n*-hexane.

5.18.1.4 Solution mère 3 — Polyinsaturée

Dans une fiole jaugée de 100 ml, peser à 0,1 mg près, environ 25 mg d'ester méthylque d'acide linolélaïdique (C18:2 tout *trans*-9,12 ou *n*-6 *trans*), 25 mg d'ester méthylque d'acide linoléique (C18:2 tout *cis*-9,12 ou *n*-6), 25 mg d'ester méthylque d'acide gamma-linoléique (C18:3 tout *cis*-9,12 ou *n*-6), 25 mg d'ester méthylque d'acide linolénique (C18:3 tout *cis*-12,15 ou *n*-3), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-11,14-éicosadiénoïque (C20:2 tout *cis*-11,14 ou *n*-6), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-8,11,14-éicosatriénoïque (C20:3 tout *cis*-8,11,14 ou *n*-6), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-11,14,17-éicosatriénoïque (C20:3 tout *cis*-11,14,17 ou *n*-3), 25 mg d'ester méthylque d'acide arachidonique (C20:4 tout *cis*-5,8,11,14 ou *n*-6), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-13,16-docosadiénoïque (C22:2 *cis*-13,16 ou *n*-6), 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-5,8,11,14,17-éicosapentaénoïque (C20:5 tout *cis*-5,8,11,14,17 ou *n*-3) et 25 mg d'ester méthylque d'acide *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque (C22:6 *cis*-4,7,10,13,16,19 ou *n*-3). Compléter jusqu'au trait avec du *n*-hexane.

5.18.1.5 Préparation des solutions d'étalonnage EMAG

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire à la pipette 25,0 ml de solution mère étalon 1 (5.18.1.2), 25,0 ml de solution mère étalon 2 (5.18.1.3) et 25,0 ml de solution mère étalon 3 (5.18.1.4). Compléter ensuite jusqu'au trait avec du *n*-hexane. Diluer en fonction du type d'injecteur utilisé.

Cette solution est stable pendant environ six mois si elle est conservée à l'abri de la lumière et à -20 °C. Pour empêcher toute contamination de la solution étalon, la répartir dans différents flacons (prêts à l'injection) et conserver ces flacons à -20 °C avant de les utiliser. Utiliser chaque flacon une fois puis le jeter.

5.18.2 Préparation à partir d'un mélange quantitatif d'étalons EMAG

5.18.2.1 Mélange quantitatif d'étalons EMAG

Acheter un mélange quantitatif d'étalons EMAG: Nu-Check-Prep, réf. GLC-Nestle-36²⁾.

Le mélange étalon d'EMAG est soigneusement préparé en masse par le fabricant. Le pourcentage en masse de chaque composant est indiqué dans le certificat joint. Chaque ampoule contient environ 100 mg du mélange étalon d'EMAG. Tous les étalons EMAG individuels sont répartis en proportions égales dans le mélange étalon, excepté l'ester méthylique d'acide palmitique (C16:0) qui est ajouté en double quantité.

5.18.2.2 Préparation du mélange étalon EMAG

Avant utilisation, laisser l'ampoule s'équilibrer à température ambiante (25 °C maximum) à l'abri de la lumière sans la chauffer. Couper l'ampoule avec un couteau en verre et, à l'aide d'une pipette Pasteur, transférer rapidement son contenu dans une fiole jaugée de 50 ml préalablement tarée, peser et compléter jusqu'au trait avec du *n*-hexane. Diluer en fonction du type d'injecteur utilisé.

Cette solution est stable pendant environ six mois si elle est conservée à l'abri de la lumière et à -20 °C. Pour empêcher toute contamination de la solution étalon, la répartir dans différents flacons (prêts à l'injection) et conserver ces flacons à -20 °C avant de les utiliser. Utiliser chaque flacon une fois puis le jeter.

6 Appareillage

AVERTISSEMENT — Étant donné que la détermination implique l'utilisation de solvants inflammables volatils, l'ensemble des appareils électriques doit être conforme à la législation relative aux dangers liés à l'utilisation de ces solvants.

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Balance analytique, précise à 1 mg près, avec une lisibilité de 0,1 mg.

6.2 Fioles jaugées, ayant des capacités de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 300 ml et 500 ml.

6.3 Pipettes volumétriques à un trait, ayant des capacités de 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml et 50 ml, de classe AS (ISO 1042).

6.4 Pipettes volumétriques à deux traits, ayant des capacités de 2 ml et 5 ml, de classe AS (ISO 1042).

6.5 Micropipette, d'une capacité de 200 µl.

6.6 Distributeurs, ayant des capacités de 2 ml, 5 ml et 10 ml.

6.7 Tube à essai, de 26 mm de diamètre, de 100 mm de longueur, équipé d'un bouchon à vis garni de PTFE.

6.8 Agitateur Vortex-Genie pour tubes à essai, ou équivalent.

6.9 Centrifugeuse de laboratoire, équipée d'adaptateurs pour tubes à essai d'un diamètre extérieur de 26 mm.

2) Nu-Check-Prep GLC-Nestle-36 est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

6.10 Chromatographe gaz-liquide, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur à débit divisé/non divisé ou d'un injecteur en tête de colonne. L'échantillonneur automatique et le système d'intégration sont de préférence informatisés.

Il est nécessaire d'utiliser la verrerie et les bouchons les plus propres possible pour éviter la présence d'impuretés dans le chromatogramme EMAG.

6.10.1 Gaz vecteur, hydrogène ou hélium, pureté $\geq 99,9997\%$.

NOTE L'utilisation d'hydrogène ou d'hélium comme gaz vecteur affecte principalement la durée de la chromatographie (soit une augmentation de 10 min à 15 min avec l'hélium) et n'a aucun impact significatif sur la résolution chromatographique avec des conditions optimisées.

Il convient que les autres gaz nécessaires pour le détecteur (FID) soient exempts d'impuretés organiques (par exemple CnHm à moins de 1 ppm) et soient d'une pureté au moins supérieure ou égale à 99,995 %. De l'air synthétique ou de l'air comprimé peut être utilisé. L'utilisation d'un générateur de gaz est également possible.

6.10.2 Colonne capillaire, liée à une phase cyanopropyl-polysiloxane ou équivalente (100 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur, 0,2 micron d'épaisseur de film), qui élue les EMAG principalement par la longueur de la chaîne carbonée et secondairement par le nombre de liaisons doubles.

Toute trace d'oxygène et d'humidité endommagera la phase polaire de la colonne. Si aucun gaz pur n'est disponible, utiliser un filtre de purification des gaz.

6.10.3 Détecteur à ionisation de flamme, pouvant être chauffé à une température de 50 °C de plus que la température finale du four de la colonne.

6.10.4 Injecteur à débit divisé/non divisé, pouvant être chauffé à une température de 30 °C de plus que la température finale du four de la colonne.

6.10.5 Injecteur en tête de colonne, capable de ne pas être chauffé (froid) ou d'être chauffé à une température de 30 °C de plus que la température finale du four de la colonne.

NOTE Il est possible d'installer un seul injecteur (c'est-à-dire, à débit divisé/non divisé ou en tête de colonne) sur l'instrument CG.

6.10.6 Seringue d'injection, d'une capacité de 10 µl.

6.10.7 Système d'intégration.

6.11 Conditions de chromatographie en phase gazeuse

La température du four et l'écoulement du gaz vecteur dépendent du choix de la colonne ainsi que du gaz vecteur employé (c'est-à-dire, hydrogène ou hélium). Dans tous les cas, les conditions choisies doivent provoquer la séparation entre la zone *cis* et *trans* pour le C18:1, le C18:2, le C18:3 et les acides linoléiques conjugués (ALC), comme illustré dans l'[Annexe B, Figures B.1, B.2 et B.3](#).

Les exemples donnés en [6.11.1](#) et [6.11.2](#) répertorient les conditions applicables pour une séparation/identification correcte des isomères *cis* et *trans*.

6.11.1 Exemple 1 — Mode d'injection à débit divisé

- Colonne: 100 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur, 0,2 µm d'épaisseur de film, colonne capillaire en silice fondue.
- Phase stationnaire: cyanopropyl-polysiloxane.

- Type de gaz vecteur: hélium.
- Pression du gaz vecteur en tête de colonne: 225 kPa (175 kPa – 225 kPa).
- Débit de division: 25,5 ml/min.
- Rapport de division: 10:1.
- Température de l'injecteur: 250 °C.
- Température du détecteur: 275 °C.
- Programme de températures du four: température initiale de 60 °C, maintenue pendant 5 min, augmentée à un débit de 15 °C min⁻¹ jusqu'à 165 °C, maintenue à cette température pendant 1 min puis augmentée à un débit de 2 °C min⁻¹ jusqu'à 225 °C pendant 20 min.
- Quantité d'échantillon injectée: 1,0 µl.

Un exemple du profil CG complet obtenu avec ces conditions est donné dans l'[Annexe B, Figure B.4](#).

6.11.2 Exemple 2 — Mode d'injection en tête de colonne

- Colonne: 100 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur, 0,2 µm d'épaisseur de film, colonne capillaire en silice fondue.
- Phase stationnaire: cyanopropyl-polysiloxane.
- Type de gaz vecteur: hydrogène.
- Pression du gaz vecteur en tête de colonne: 210 kPa (175 kPa – 225 kPa).
- Température de l'injecteur: froid.
- Température du détecteur: 275 °C.
- Programme de températures du four: température initiale de 60 °C, maintenue pendant 5 min, augmentée à un débit de 15 °C min⁻¹ jusqu'à 165 °C, maintenue à cette température pendant 1 min puis augmentée à un débit de 2 °C min⁻¹ jusqu'à 225 °C pendant 17 min.
- Quantité d'échantillon injectée: 1,0 µl.

Un exemple du profil CG complet obtenu avec ces conditions est donné dans l'[Annexe B, Figure B.5](#).

6.12 Résolution entre les C18:1 *cis* et *trans*

Pour quantifier précisément les AGT C18:1 (niveau ≥ 0,5 g/100 g de matière grasse), une résolution suffisante comprise entre le C18:1 *trans*-13/14 et le C18:1 *cis*-9 (acide oléique) est nécessaire. La résolution est déterminée avec l'injection de la solution qualitative de mélange étalon d'isomères EMAG C18:1 *cis* et *trans* ([5.17](#)).

Injecter 1,0 µl de solution étalon ([5.13](#)) dans le chromatographe en phase gazeuse. Déterminer la largeur des pics à mi-hauteur et la distance entre la gauche du chromatogramme et le sommet du pic des isomères *trans*-13/14 de C18:1 et *cis*-9 de C18:1 (ester méthylique d'acide oléique). Le critère de résolution *R* est calculé à l'aide de la Formule (1):

$$R = 1,18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{\left(\frac{1}{2}\right)_1} + W_{\left(\frac{1}{2}\right)_2}) \quad (1)$$

où

t_{R1} est la distance, en centimètres, entre la gauche du chromatogramme et le sommet du pic 1 (C18:1 *trans*-13/14);

t_{R2} est la distance, en centimètres, entre la gauche du chromatogramme et le sommet du pic 2 (C18:1 *cis*-9);

$W_{\left(\frac{1}{2}\right)_1}$ est la largeur de pic, en centimètres, à mi-hauteur, du pic 1 (C18:1 *trans*-13/14);

$W_{\left(\frac{1}{2}\right)_2}$ est la largeur de pic, en centimètres, à mi-hauteur, du pic 2 (C18:1 *cis*-9).

La résolution est suffisante lorsque le critère R est $\geq 1,00 \pm 5 \%$ (voir l'[Annexe B](#), [Figure B.3](#)).

NOTE Si la résolution est insuffisante mais que le critère R est proche de la valeur cible, le réglage précis des conditions chromatographiques (c'est-à-dire, légère modification de la pression/du débit du gaz vecteur ou du programme de températures du four) peut donner une valeur R acceptable.

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif et non endommagé ou modifié par le transport ou le stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée dans l'ISO 707|FIL 50.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

8.1 Lait liquide, lait en poudre et formule infantile ayant une teneur en matière grasse $\geq 1,5 \%$ m/m

Porter l'échantillon à température ambiante et agiter vigoureusement avant utilisation. S'assurer que l'échantillon est homogène (c'est-à-dire, bien mélanger).

8.2 Lait liquide, lait en poudre et formule infantile ayant une teneur en matière grasse $< 1,5 \%$ m/m

Porter l'échantillon à température ambiante et agiter vigoureusement avant utilisation. S'assurer que l'échantillon est homogène (c'est-à-dire, bien mélanger).

Extraire la matière grasse conformément à l'ISO 14156|FIL 172 en veillant à évaporer complètement le(s) solvant(s) d'extraction en chauffant à une température n'excédant pas 40°C pour éviter toute dégradation des acides gras polyinsaturés à chaîne longue (AGPI-CL).

NOTE Voir également l'ISO 1211|FIL 1, l'ISO 1737|FIL 13, l'ISO 8381|FIL 123 et l'ISO 8262-1|FIL 124-1 pour des informations utiles sur les méthodes d'extraction des matières grasses.

8.3 Fromage

Porter l'échantillon à température ambiante. S'assurer que l'échantillon est homogène (c'est-à-dire, bien mélanger).

Extraire la matière grasse conformément à l'ISO 1735|FIL 5 en veillant à éliminer complètement le solvant d'extraction en chauffant la matière grasse à une température n'excédant pas 60°C .