

Analyse lipidique

non-polar

medium polar

highly polar

Dr Laib

16:0 _____

16:0 _____

16:0 _____

18:2/18:3 _____

18:1 _____

18:0 _____

18:0 _____

18:1 _____

18:2 _____

18:3 _____

18:0 _____

18:1 _____

18:2 _____

20:0 _____

20:0 _____

20:0 _____

18:3 _____

Tableau 1. Noms et désignations de certains acides gras les plus courants

Fatty acid	Common Name	Abbreviation
Butanoic acid	Butyric acid	C4:0
Decanoic acid	Caproic acid	C10:0
Dodecanoic acid	Lauric acid	C12:0
Tetradecanoic acid	Myristic acid	C14:0
Hexadecanoic acid	Palmitic acid	C16:0
Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid	C16:1
Octadecanoic acid	Stearic acid	C18:0
<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid	Oleic acid	C18:1- <i>cis</i> (n9)
<i>trans</i> -9-Octadecenoic acid	Elaidic acid	C18:1- <i>trans</i> (n9)
all <i>cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid	C18:2 - <i>cis</i> (n6)
all <i>trans</i> -9,12-Octadecadienoic acid	Linolelaidic acid	C18:2 - <i>trans</i> (n6)

all <i>cis</i>-9,12,15-Octadecatrienoic acid	α -Linolenic acid	C18:3 (n3) <i>DrLaib</i>
all <i>cis</i>-6,9,12-Octadecatrienoic acid	γ -Linolenic acid	C18:3 (n6)
Eicosanoic acid	Arachidic acid	C20:0
<i>cis</i>-11-Eicosenoic acid		C20:1 (n9)
all <i>cis</i>-11,14-Eicosadienoic acid		C20:2 (n6)
all <i>cis</i>-11,14,17-Eicosatrienoic acid		C20:3 (n3)
all <i>cis</i>-8,11,14-Eicosatrienoic acid	Dihomogammalinolenic acid	C20:3 (n6)
all <i>cis</i>-5,8,11,14-Eicosatetraenic acid	Arachidonic acid	C20:4 (n6)
all <i>cis</i> 5,8,11,14,17-Eicosapentenoic acid	EPA	C20:5 (n3)
Docosanoic acid	Behenic acid	C22:0
<i>cis</i>-13-Docosenoic acid	Erucic acid	C22:1 (n9)
all <i>cis</i>-7,10,13,16-Docosatetraenoic acid		C22:4 (n6)
all <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19-Docosahexenoic acid	DHA	C22:6 (n3)
Tetracosanoic acid	Lignoceric acid	C24:0
<i>cis</i>-15-tetracosenoic acid	Nervonic acid	C24:1 (n9)

Pour la caractérisation de la fraction lipidique, *Dr Laib*
les triglycérides sont hydrolysés (**saponifiés**) en
glycérol et **acides gras libres**. Bien que les acides gras
libres puissent être analysés directement sur des
phases stationnaires polaires (colonne **HP-FFAP**), des
données chromatographiques plus robustes et
reproductibles sont obtenues si les **acides gras** sont
dérivés en esters méthyliques.

Pour la **dérivatisation**, y compris l'**hydrolyse** et la **méthylation**, différentes méthodes sont disponibles.

Ces méthodes sont faciles à utiliser, ne nécessitent pas de réactifs ou d'équipements coûteux.

Après préparation des **FAME**, ils sont séparés selon le nombre de carbones (**nombre d'atomes de carbone** dans la chaîne des acides gras,

hors le carbone de l'ester méthylique) et le degré d'insaturation. De plus, la position de la ou des doubles liaisons et la configuration géométrique (cis/trans) sont également des paramètres importants et leur détermination ajoute des informations supplémentaires à la caractérisation de la fraction lipidique dans les aliments.

3 phases stationnaires sont comparées pour la séparation des FAME. La première méthode utilise DB-Wax, une colonne de polyéthylène glycol, dans laquelle les FAME de C4 (acide butyrique) à C24 (acide lignocérique) peuvent être séparés en fonction du nombre de carbones et du degré d'insaturation. Sur ces colonnes, aucune séparation des isomères cis et trans n'est obtenue, et pour les mélanges complexes, comme les huiles de poisson,

certaines FAME sont **difficiles à séparer**. Cependant, la séparation des **FAME** sur colonnes de polyéthylène glycol est largement utilisée et est appliquée à la caractérisation d'échantillons « **classiques** », tels que les **huiles végétales** de maïs, d'olive et de soja. Les graisses animales peuvent également être analysées. Une application importante est l'analyse de l'**acide butyrique** dans la **matière grasse du lait**.

La concentration d'acide butyrique dans le lait est un indicateur important de la qualité du lait, et son analyse est donc très importante dans le lait, les produits laitiers et le chocolat. Pour l'analyse d'échantillons complexes, tels que les huiles de poisson, une résolution supplémentaire des FAME est nécessaire et est obtenue à l'aide d'une colonne capillaire recouverte d'une phase stationnaire cyanopropylique, telle qu'un DB-23.

Sur cette colonne, les acides gras hautement insaturés, tels que tous les esters méthyliques de l'acide **cis 5, 8, 11, 14, 17-eicosapenténoïque (EPA, C20:5 ω 3)** et tous les **cis 4,7,10,13,16,19**. L'ester méthylique de l'acide docosahexénoïque (**DHA, C22:6 ω 3**) est séparé des autres **FAME**.

Cette analyse est très importante dans le cadre de l'intérêt récent porté à la détermination des acides gras **oméga-3**.

Sur la colonne cyanopropylique, la séparation des isomères cis et trans est également possible. En raison de l'interaction plus forte de l'isomère cis avec le cyano-dipôle, les isomères trans s'éluent avant les isomères cis. De cette manière, la détermination des acides gras trans est également effectuée, mais la polarité de la phase stationnaire n'est pas suffisante pour séparer complètement les mélanges cis-trans complexes.

Pour la séparation d'un mélange **FAME** complexe contenant une quantité relativement importante d'acides gras **trans**, une colonne **HP-88** **hautement polaire** est **préférée**. Sur cette colonne hautement polaire permet d'obtenir une excellente séparation entre les différents **isomères cis** et **trans**, cependant, certains acides gras de poids moléculaire plus élevé sont plus difficiles à séparer. Un aperçu des colonnes et de leur domaine d'application est résumé dans la **figure 1**.

L'ensemble de l'échantillon a été dilué dans 10 ml d'hexane (concentration finale = 0,2 à 0,4 mg/mL par FAME) avant utilisation. Les échantillons d'huile et de graisse peuvent être préparés en utilisant différentes méthodes.

Méthode de préparation des échantillons

Peser un échantillon de 100 mg dans un tube à essai de 20 ml (avec bouchon à vis) ou un flacon de réaction.

Dissoudre l'échantillon dans 10 ml d'hexane. Ajouter 100 μ L d'hydroxyde de potassium 2 N dans le méthanol (11,2 g dans 100 ml). Fermez le tube ou le flacon et vortexez pendant 30 s. Centrifuger. Transférez le surnageant clair dans un flacon d'échantillonneur automatique de 2 mL.

Conditions analytiques

Les analyses ont été effectuées sur un GC Agilent 6890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'injection fractionnée automatisée a été réalisée à l'aide d'un échantillonneur automatique Agilent 7683. La configuration instrumentale et les conditions analytiques sont résumées dans le tableau 2 (colonne DB-Wax), tableau 3 (colonne DB-23) et tableau 4 (colonne HP-88).

FAME Analysis

DB-Wax

No *cis-trans*
Some overlap
"Simple" mixtures
Milk fat

DB-23

Complex mixtures
Partial *cis-trans* separation
Omega 3 (EPA, DHA) analysis
Fish oils

HP-88

Complex mixtures
Excellent *cis-trans* separation
Olive oil
Refined (hydrogenated) oils

1. Colonne DB-Wax

Instrumentation

Chromatographic system : Agilent 6890 GC

Inlet : Split/Splitless

Detector : FID or Agilent 5973 MSD

Automatic Sampler : Agilent 7683

Liner : Split liner (p/n 5183-4647)

Column : 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m DB-Wax (J&W 122-7032)

Experimental Conditions GC-FID

Inlet temperature : 250 °C

Injection volume : 1 μ L

Split ratio : 1/50

Carrier gas : Hydrogen

Head pressure : 53 kPa constant pressure (36 cm/s at 50 °C)

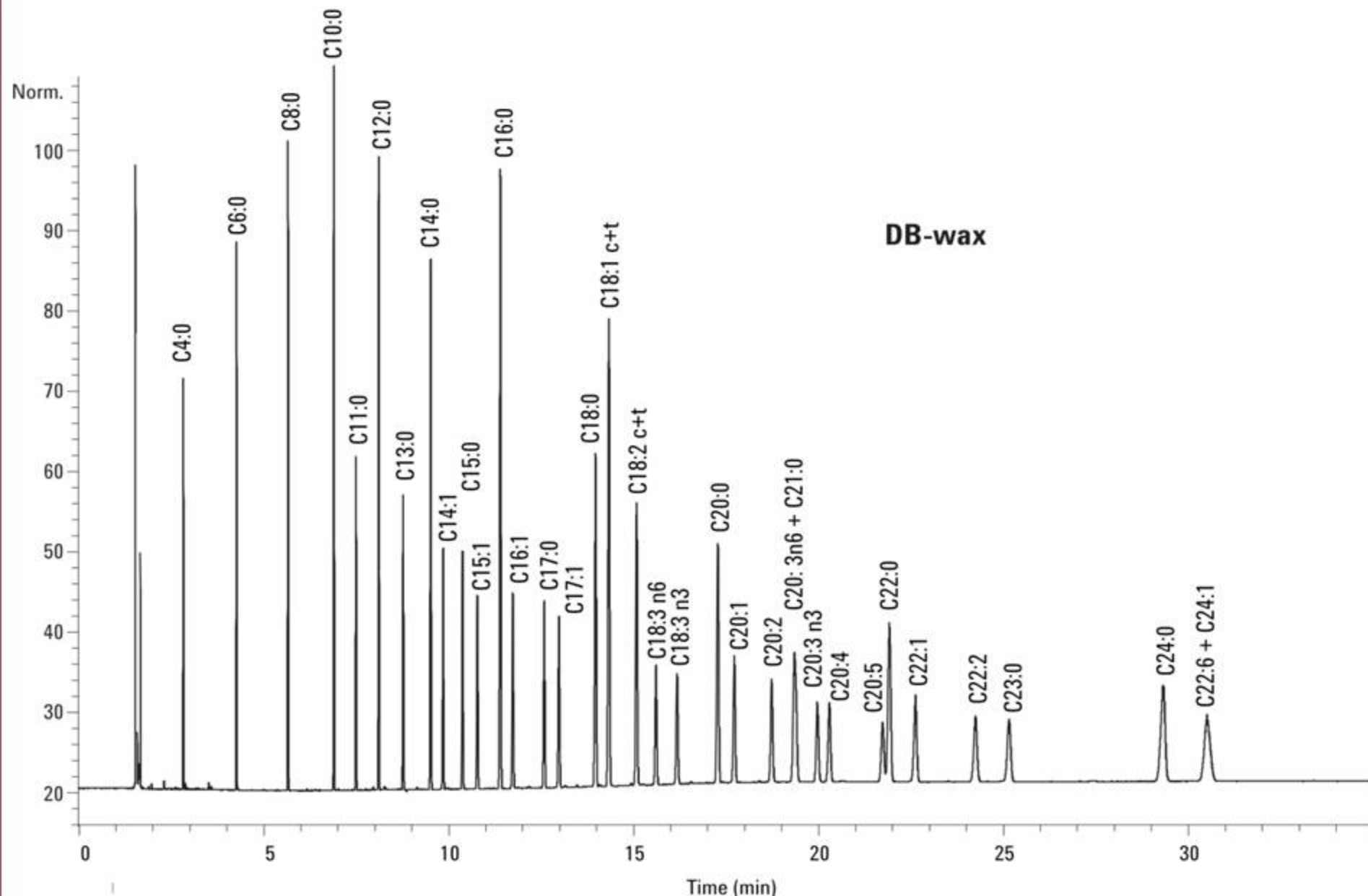
Oven temperature : 50 °C, 1 min, 25 °C/min to 200 °C, 3 °C/min to 230 °C, 18 min.

Detector temperature : 280 °C

Detector gases : Hydrogen : 40 mL/min; Air: 450 mL/min; Helium make-up gas: 30 mL/min.

Colonne DB-Wax

Dr Laib



1. Colonne DB-23

Instrumentation

Chromatographic system : Agilent 6890 GC

Inlet : Split/Splitless

Detector : FID or Agilent 5973 MSD

Automatic Sampler : Agilent 7683

Liner : Split liner (p/n 5183-4647)

Column : 60 m x 0.25 mm ID, 0.15 μ m DB-23 (J&W 122-2361)

Experimental Conditions GC-FID

Inlet temperature : 250 °C

Injection volume : 1 μ L

Split ratio : 1/50

Carrier gas : Helium

Head pressure : 230 kPa constant pressure (33 cm/s at 50 °C)

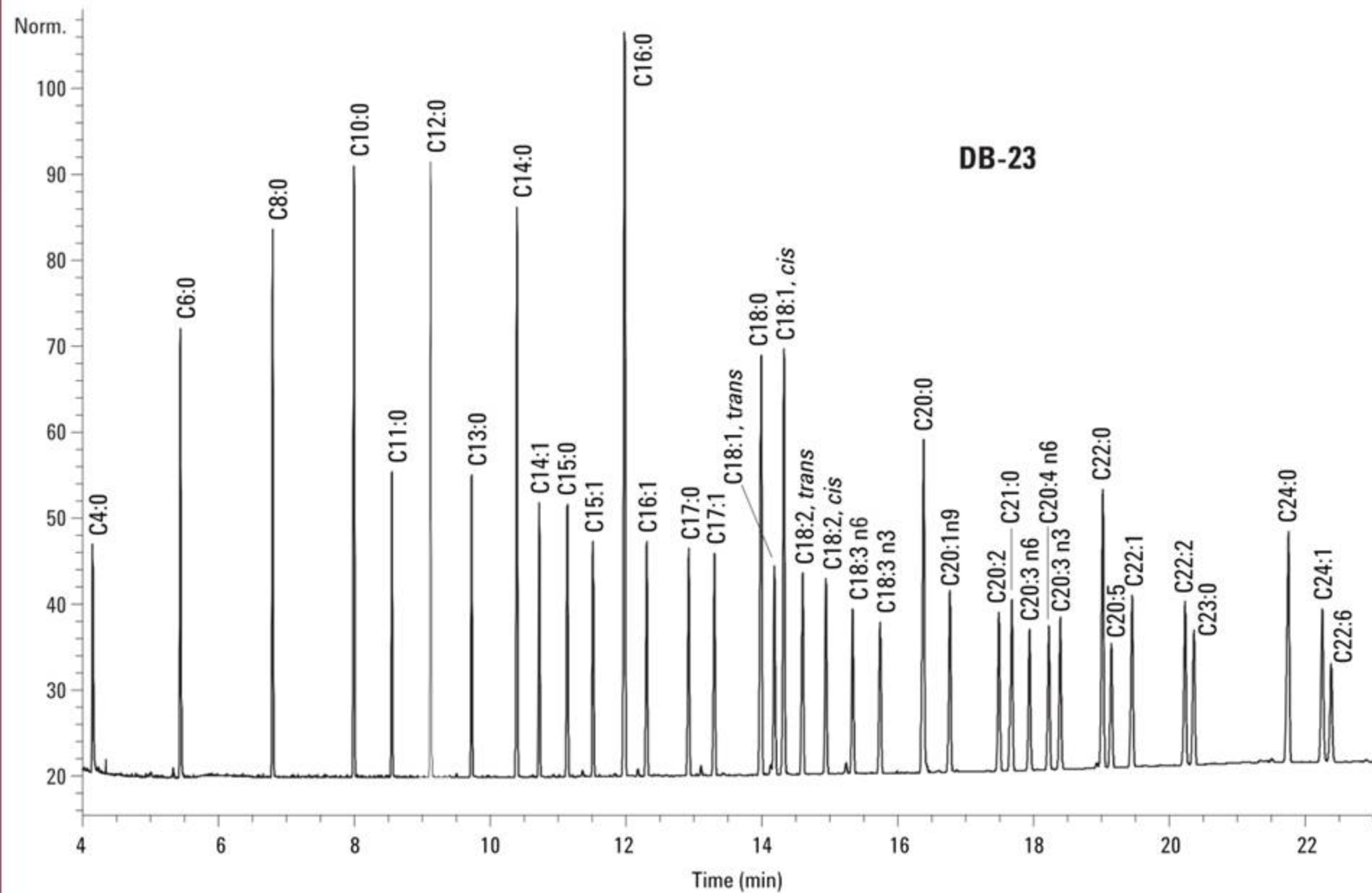
Oven temperature : 50 °C, 1 min, 25 °C/min to 175 °C, 4 °C/min to 230 °C, 5 min.

Detector temperature : 280 °C

Detector gases : Hydrogen: 40 mL/min; Air: 450 mL/min; Helium make-up gas: 30 mL/min.

Colonne DB-23

Dr Laib



3. Colonne HP-88

Table 4. HP-88 Methods 3A and 3B

Dr Laib

Instrumentation

Chromatographic system : Agilent 6890 GC

Inlet : Split/Splitless

Detector : FID or Agilent 5973 MSD

Automatic Sampler : Agilent 7683

Liner : Split liner (p/n 5183-4647)

Column A : 100 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 (J&W 112-88A7)

Column B : 60 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 (J&W 122-8867)

Experimental Conditions GC-FID

Inlet temperature : 250 °C

Injection volume : 1 μ L

Split ratio : 1/50

Carrier gas A : Hydrogen

Carrier gas B : Helium

Head pressure : 2 mL/min constant flow

Oven temperature A : 120 °C, 1 min, 10 °C/min to 175 °C, 10 min, 5 °C/min to 210 °C, 5 min

5 °C/min to 230 °C, 5 min

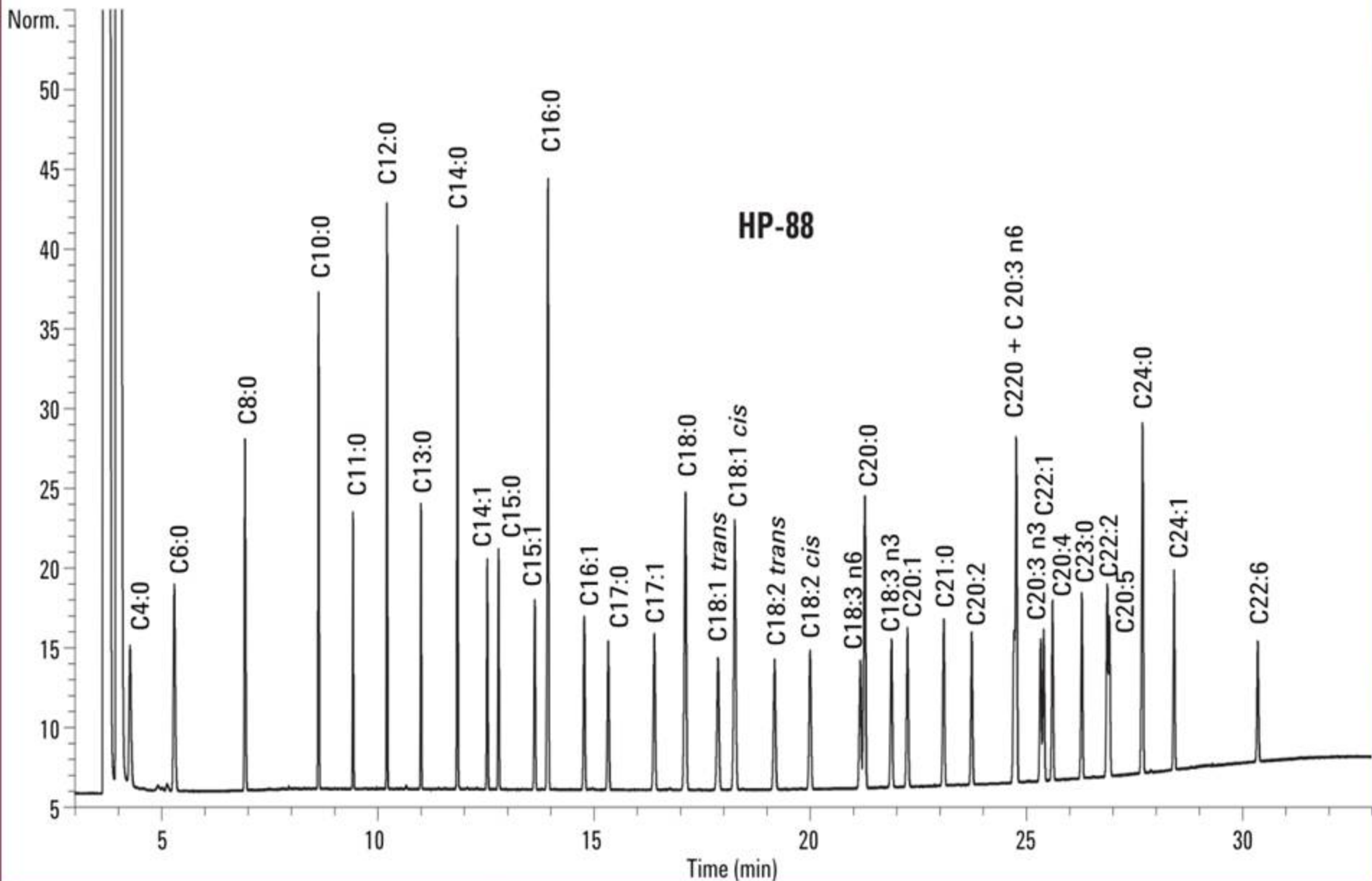
Oven temperature B : 175 °C, 10 min, 3 °C/min, 220 °C, 5 min

Detector temperature : 280 °C

Detector gases : Hydrogen: 40 mL/min; Air: 450 mL/min; Helium make-up gas: 30

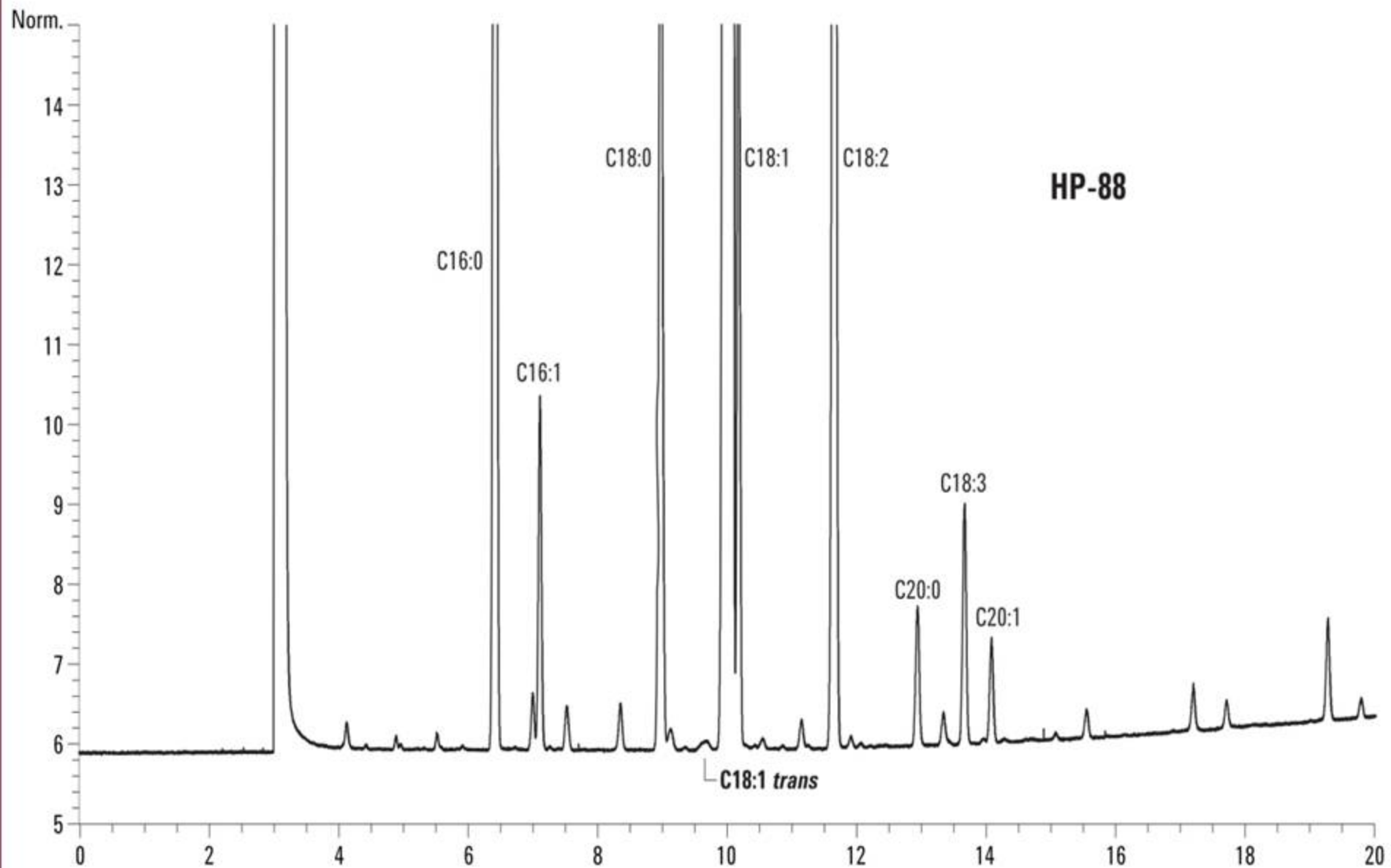
Colonne HP-88

Dr Laib



Colonne HP-88

Dr Laib



3 types de phases stationnaires peuvent être utilisés pour l'**analyse** des **FAME**.

1. Une colonne **DB-Wax** est utile pour l'analyse des **huiles** et **graisses comestibles classiques**, y compris la détermination de l'**acide butyrique** dans les matières **grasses du lait**. Cependant, en utilisant cette colonne, **aucune séparation des isomères cis-trans n'est obtenue**.

2. Une colonne cyanopropylique **DB-23** **moyennement polaire** est **excellente** pour l'analyse de **mélanges complexes** d'**EMAG**, y compris les **huiles de poisson**, permettant la détermination des acides gras **oméga 3** tels que l'**EPA** et le **DHA**. Une **séparation cis-trans partielle** est obtenue.

3. Pour la **séparation cis-trans** la **plus exigeante**, une colonne **HP-88** est recommandée. Cette colonne est également la colonne de choix pour l'analyse QC de l'huile d'olive.