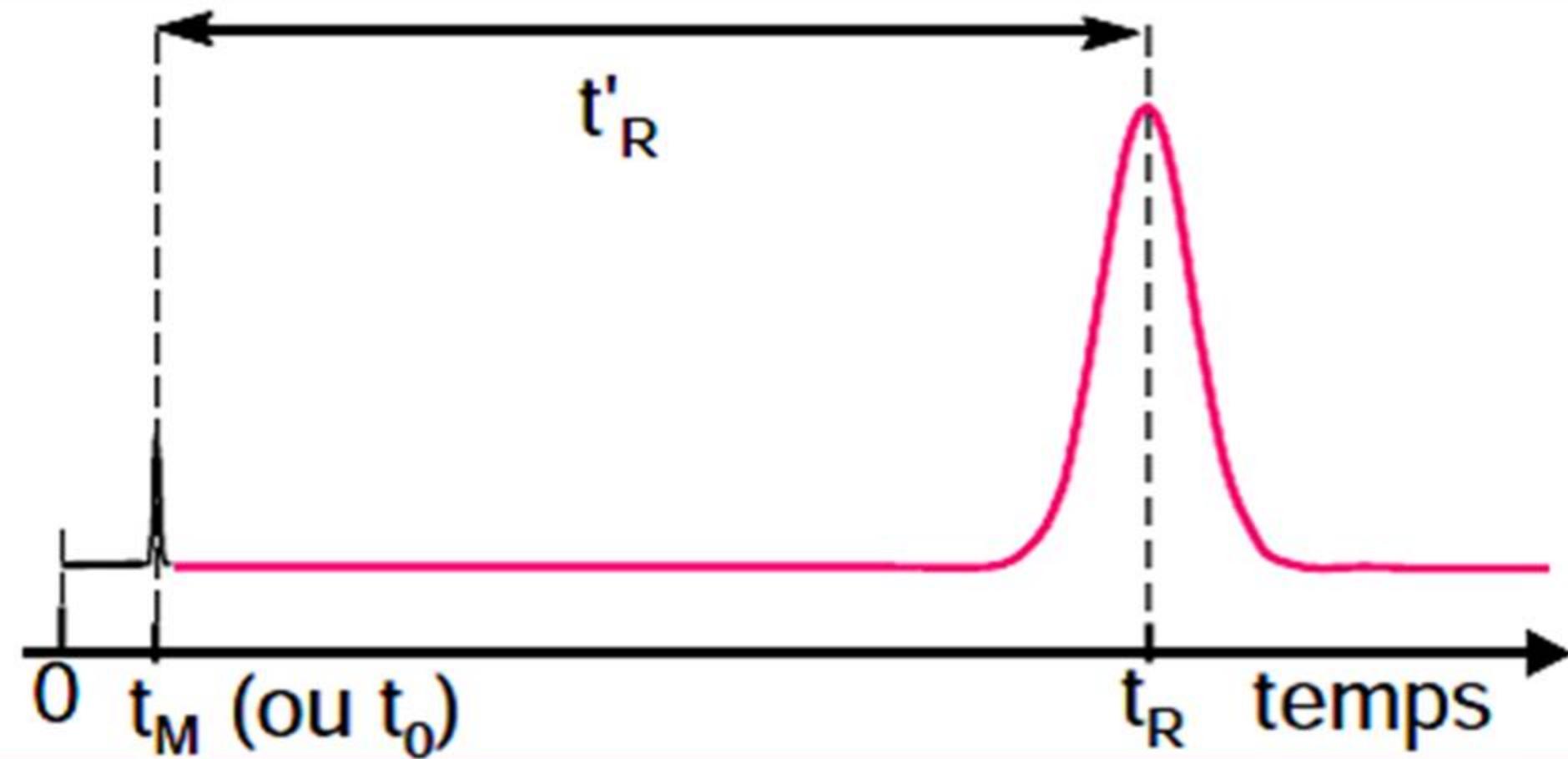


Chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (figure 1). Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée.

a) Temps de rétention

Dr Laib



Temps de rétention (t_R), qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié.

Temps de rétention t_R , qui représente le

temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié.

Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M ,

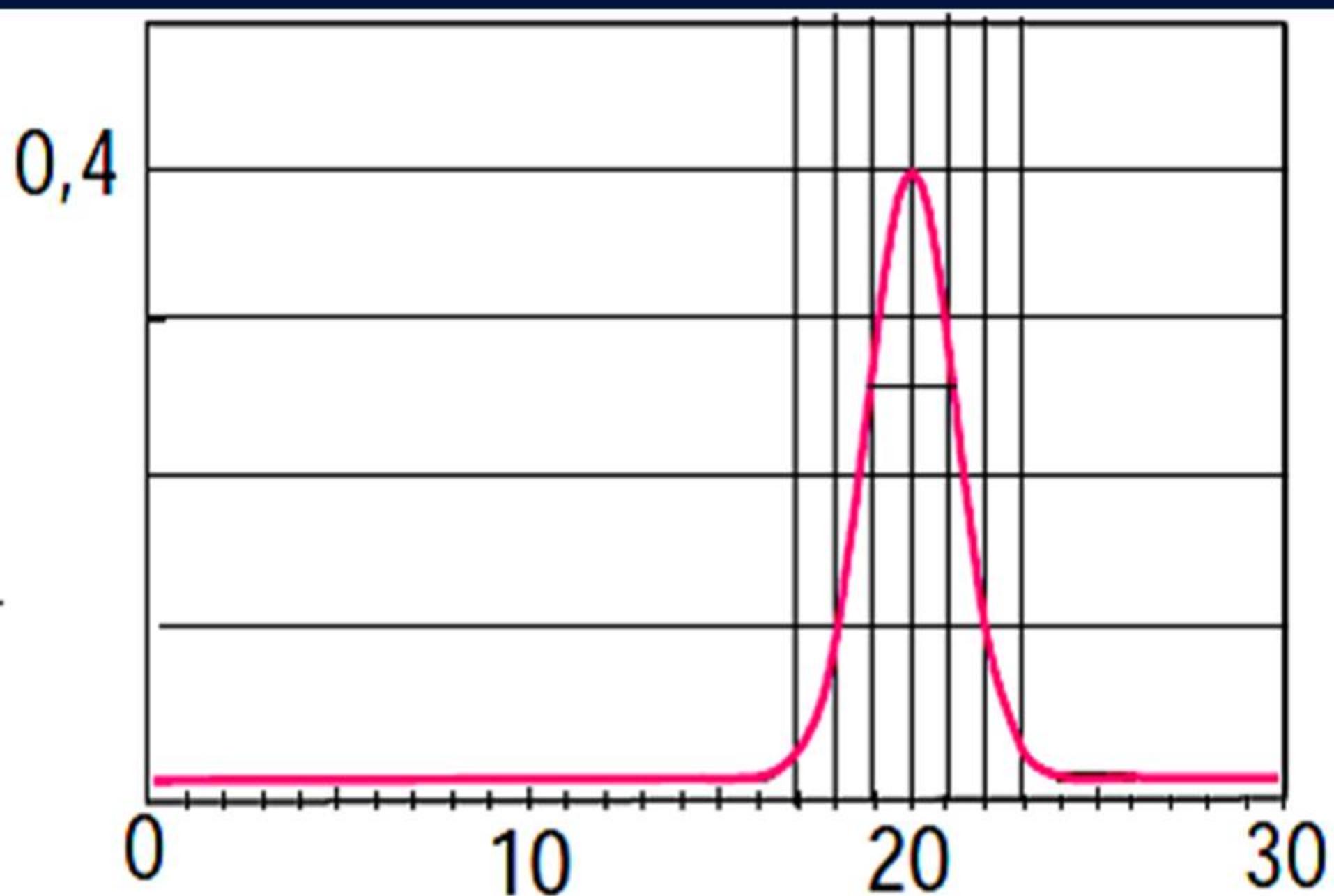
appelé temps mort (désigné également par t_0).

La différence entre le temps de rétention et le temps

mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé t'_R .

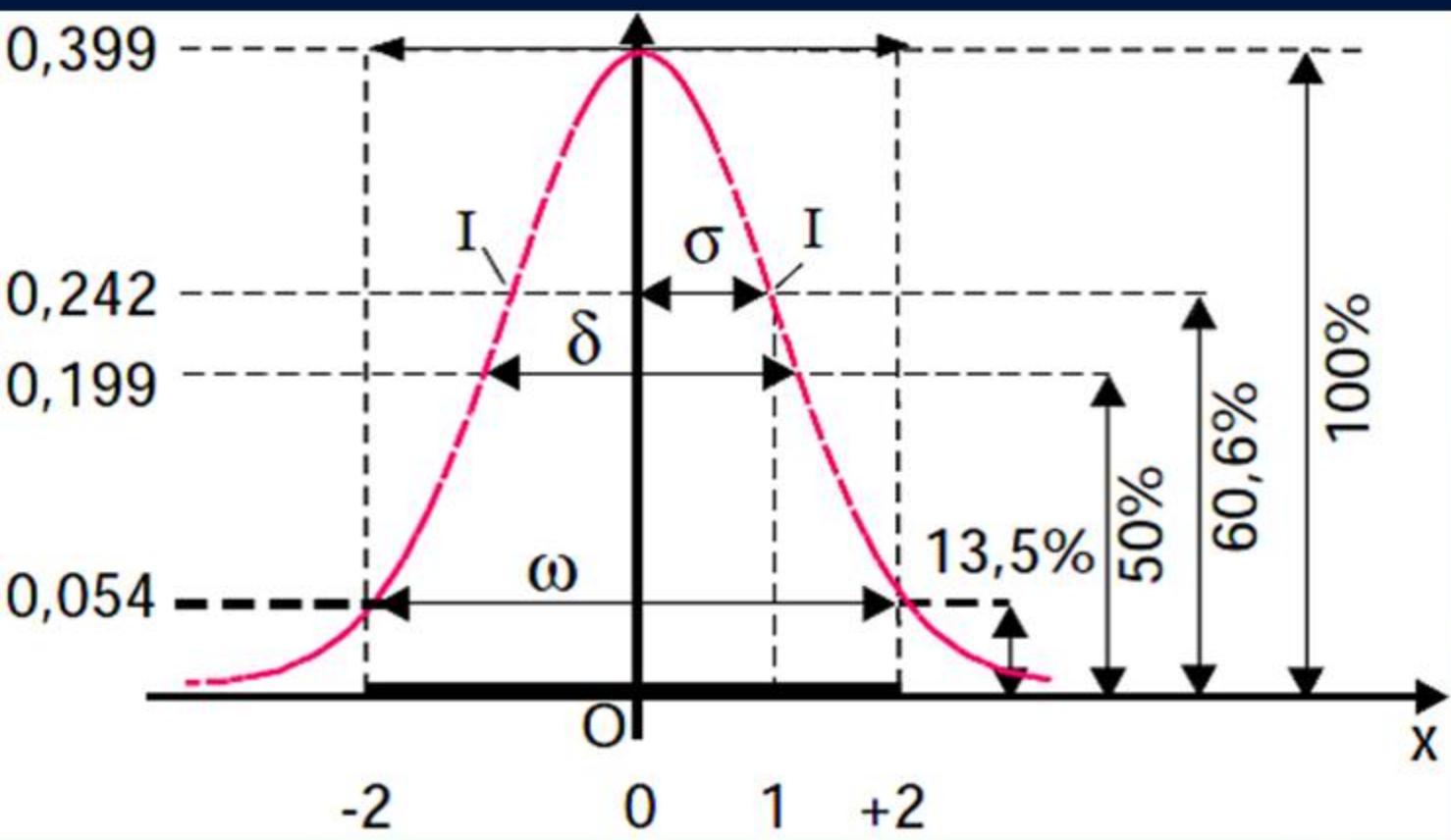
b) Courbe de Gauss avec $\mu = 20$ et $\sigma = 1$

Dr Laib



c) Caractéristiques du pic idéal

Dr Laib

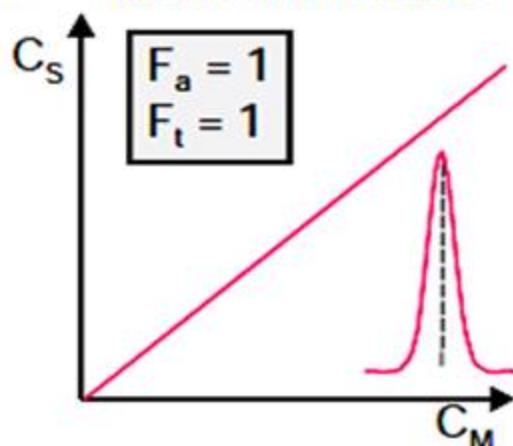
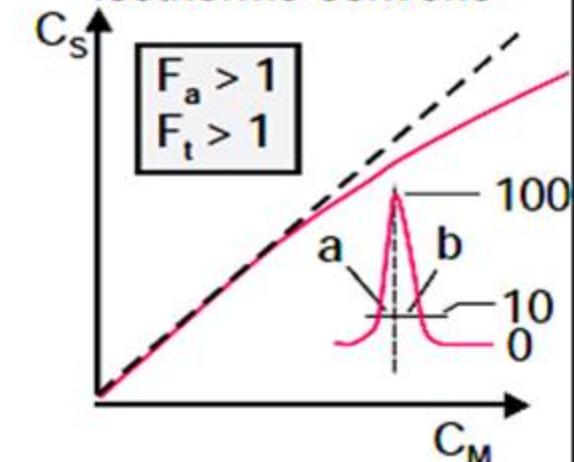
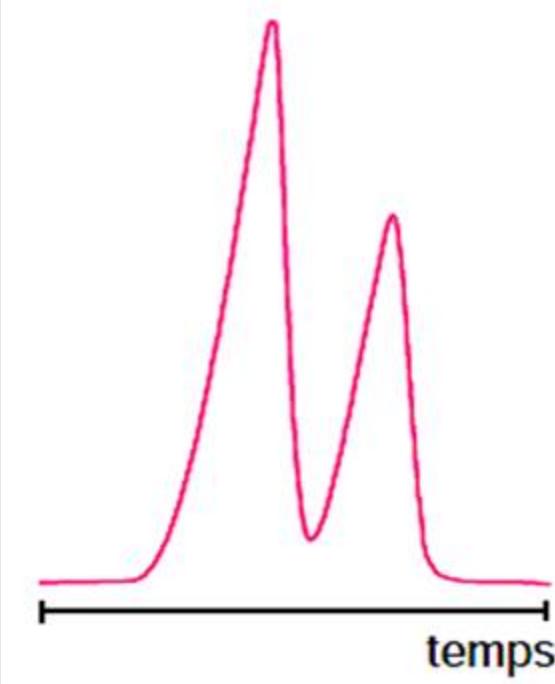
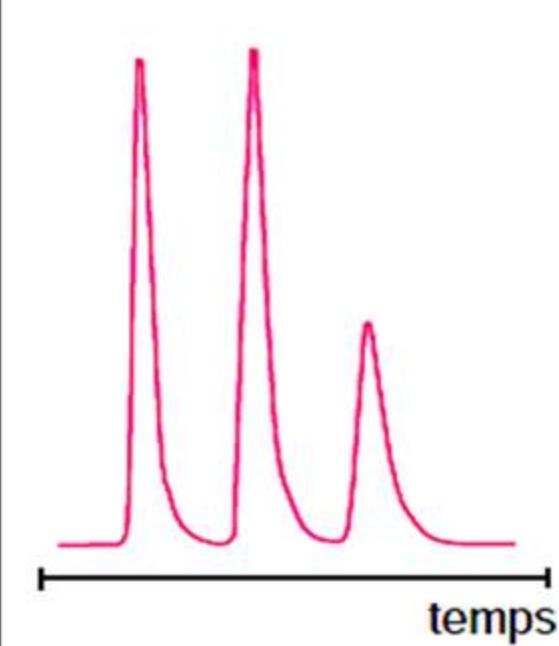
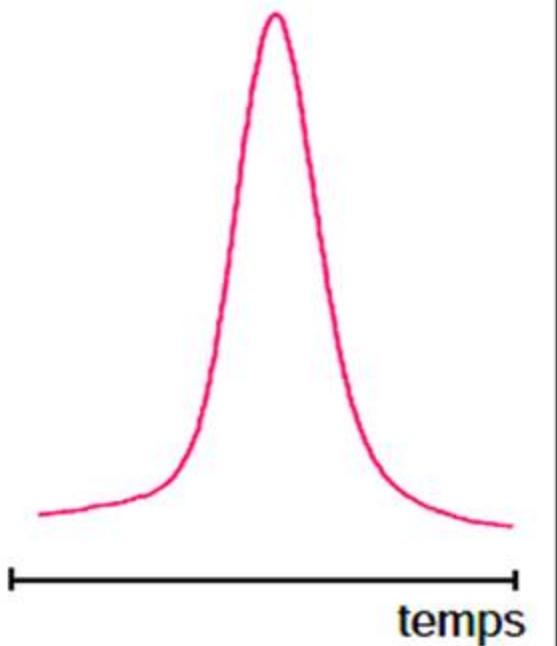
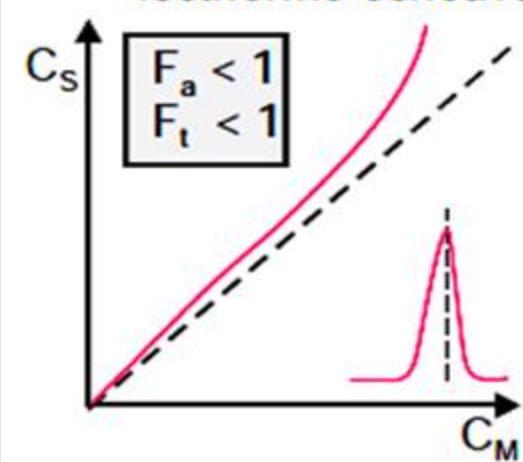


$$\begin{aligned}\delta &= 2,35 \sigma \\ \omega &= 4 \sigma \\ \omega &= 1,7 \delta\end{aligned}$$

En chromatographie, δ désigne la largeur à mi-hauteur ($\delta = 2,35 \sigma$) et σ^2 la variance du pic. La largeur « à la base » du pic, appelée ω est mesurée à 13,5 % de la hauteur, point où, la courbe étant gaussienne, on a $\omega = 4 \sigma$ par définition.

L'asymétrie observée d'un pic est traduite par deux paramètres appelés facteur d'asymétrie (F_a) et facteur de traînée (F_t), mesurés à 10 % de sa hauteur (figure 2) :

$$F_a = \frac{b}{a} \qquad F_t = \frac{a + b}{2a}$$

a *isotherme linéaire*b *isotherme convexe*c *isotherme concave*

a) Situation idéale correspondant à l'invariance *Dr Laib*

De l'isotherme de concentration;

b) Situation dans laquelle la phase stationnaire est saturée (la montée du pic est plus rapide que la descente) (facteur de traînée (F_t) plus grand que 1);

c) Situation inversée : le constituant est trop retenu dans la phase stationnaire, le temps de rétention est allongé et la montée du pic est plus lente que la descente, qui apparaît normale.

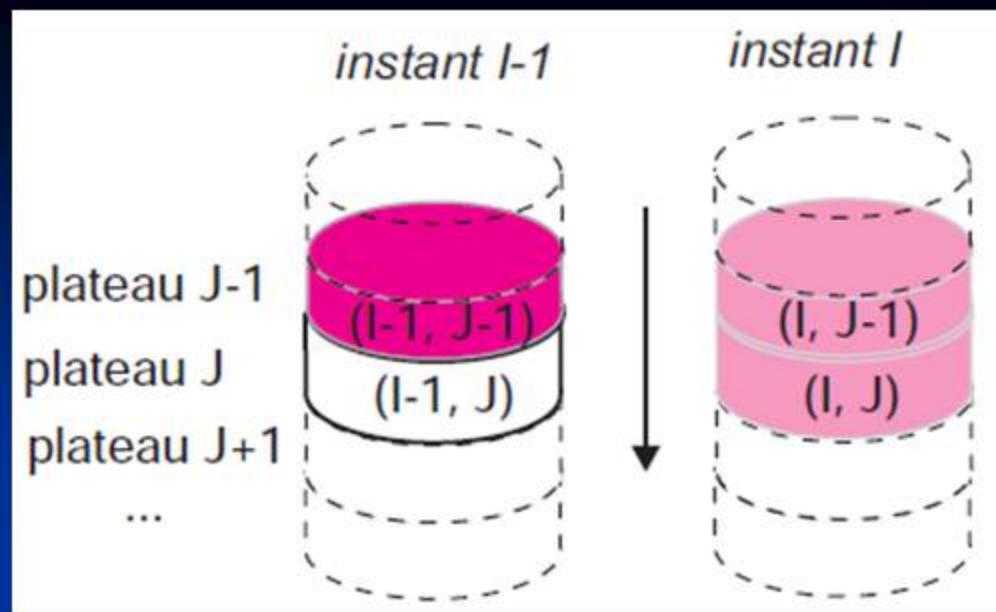
1. Modèle des plateaux

Dr Laib

Pour expliquer le mécanisme de migration et de séparation des composés dans la colonne, le modèle des plateaux de Craig, permet de décrire de manière simple les séparations.

Chaque soluté se déplace progressivement en une suite d'étapes distinctes.

Le processus élémentaire est représenté par un cycle d'adsorption/désorption.



Si on se place à l'instant I , le plateau J contient une masse totale de soluté m_T qui se compose de la quantité m_M de ce soluté qui vient d'arriver de la phase mobile du plateau $J-1$, en équilibre à l'instant $I-1$, à laquelle s'ajoute la quantité m_S déjà présente dans la phase stationnaire du plateau J à l'instant $I-1$.

Ces équilibres successifs sont à la base de la notion de plateau théorique selon lequel la colonne de longueur L est découpée en N petits disques fictifs de même Hauteur H , numérotés de 1 à n . Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté. À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé plateau

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H) vaut :

$$H = \frac{L}{N}$$

$$N = \frac{L}{H}$$

2. Coefficient (constante) de distribution de Nernst (K)

C'est le paramètre physico-chimique de base en

chromatographie qui quantifie le rapport de

concentration de chaque composé entre les deux

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

Les valeurs de K sont très variables. Elles sont grandes

(ex : 1000) lorsque la phase mobile est un gaz, et petites

(ex : 2) lorsque les deux phases sont à l'état condensé.

■ 3.1. Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

À mesure que le soluté migre dans la colonne, il occupe une zone allant s'élargissant (figure 3). Cette dispersion linéaire σ_1 , repérée par la variance σ_1^2 croît avec la distance parcourue. Lorsque cette distance vaut L , longueur de la colonne, on pose :

$$\sigma_L^2 = H \cdot L$$

En rappel du modèle de la théorie des plateaux

$$H = \frac{L}{N}$$

:

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2}$$

ou

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

- Ces deux paramètres sont accessibles de manière indirecte à partir du pic d'élution du composé. On mesure t_R et σ dont le rapport à même valeur que celui de L et de σ_L .

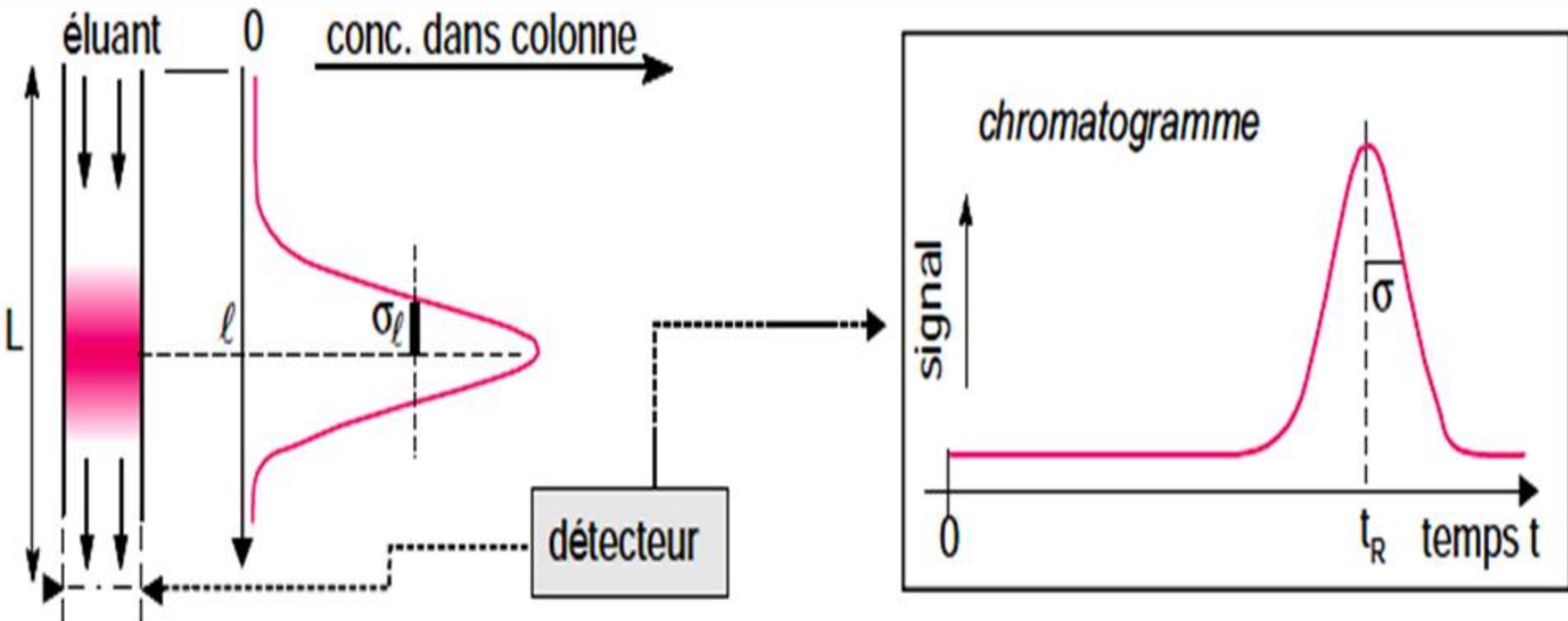


Figure 3 : La courbe de gauche correspond à une image de la concentration du composé élué à l'instant considéré ; Le chromatogramme de droite, à la variation de la concentration en sortie de colonne en fonction du temps.

Sur le chromatogramme, σ représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et t_R le temps de rétention du composé. t_R et σ doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant).

Si on exprime σ en unités de volume (en faisant intervenir le débit), 4σ correspond au «volume du pic» soit 95 % du composé injecté.

Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ($\omega = 4\sigma$),

il en résulte la formule :

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$$

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de

préférence la formule équivalente : $N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$

N est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires suivies.

3.2. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé, (cas en CPG lorsqu'on voulait comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie), on remplace le temps total t_R qui figure dans les expressions:

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} \quad \text{ou} \quad N = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$$

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$$

Par le temps de rétention réduit t'_R qui ne tient pas compte du temps mort t_M passé par le composé dans la phase mobile. Les trois précédentes expressions deviennent :

$$N_{\text{eff}} = \frac{t'_R^2}{\sigma^2}$$

$$N_{\text{eff}} = 16 \frac{t'_R^2}{\omega^2}$$

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \frac{t'_R^2}{\delta^2}$$

3.3. Hauteur de plateau

En chromatographie gazeuse, on a longtemps utilisé une valeur corrigée appelée hauteur de plateau effectif H_{eff} faisant intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique.

Le calcul de H_{eff} à partir de l'efficacité réelle utilise l'expression :

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}}$$

Hauteur de plateau réduite. En chromatographie *Dr Laib*
dont la **phase mobile** est un **liquide** et pour les colonnes
dont le **remplissage** est formé de **particules sphériques**,
on rencontre assez souvent la **hauteur de plateau réduite**,
h, qui tient compte du **diamètre moyen d_m** des particules.
On élimine en quelque sorte l'**effet de la taille des**
particules. Des colonnes présentant le même rapport
(longueur de la colonne)/(diamètre des particules)
conduisent à des performances semblables.

$$h = \frac{H}{d_m} = \frac{L}{N \cdot d_m}$$

4.1. Temps de rétention (t_R)

Le temps de rétention t_R représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_R est indépendant de la quantité injectée.

4.2. Volume d'élution ou de rétention (V_R)

- Le volume d'élution (de rétention) V_R de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D est stationnaire :
$$V_R = t_R \cdot D$$

- Volume d'un pic, V_{pic} . Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition :

$$V_{\text{pic}} = \omega \cdot D$$

4.3. Volume de la phase mobile (V_M)

- Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) V_M correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. On peut l'exprimer en fonction de t_M et du débit D :

$$V_M = t_M \cdot D$$

4.4. Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par V_s n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples :

- **Volume total interne de la colonne vide - le volume de la phase mobile.**

4.5. Facteur de rétention k (ou de capacité)

Dr Laib

- Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que k ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés.

Quand un composé de masse totale m_T est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités : m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire.

Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne.

Le rapport de m_T et m_S , appelé facteur de rétention ou de capacité (k), est indépendant de m_T :

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$

Prenons le cas d'une molécule qui passe les 9/10 de son temps dans la phase stationnaire.

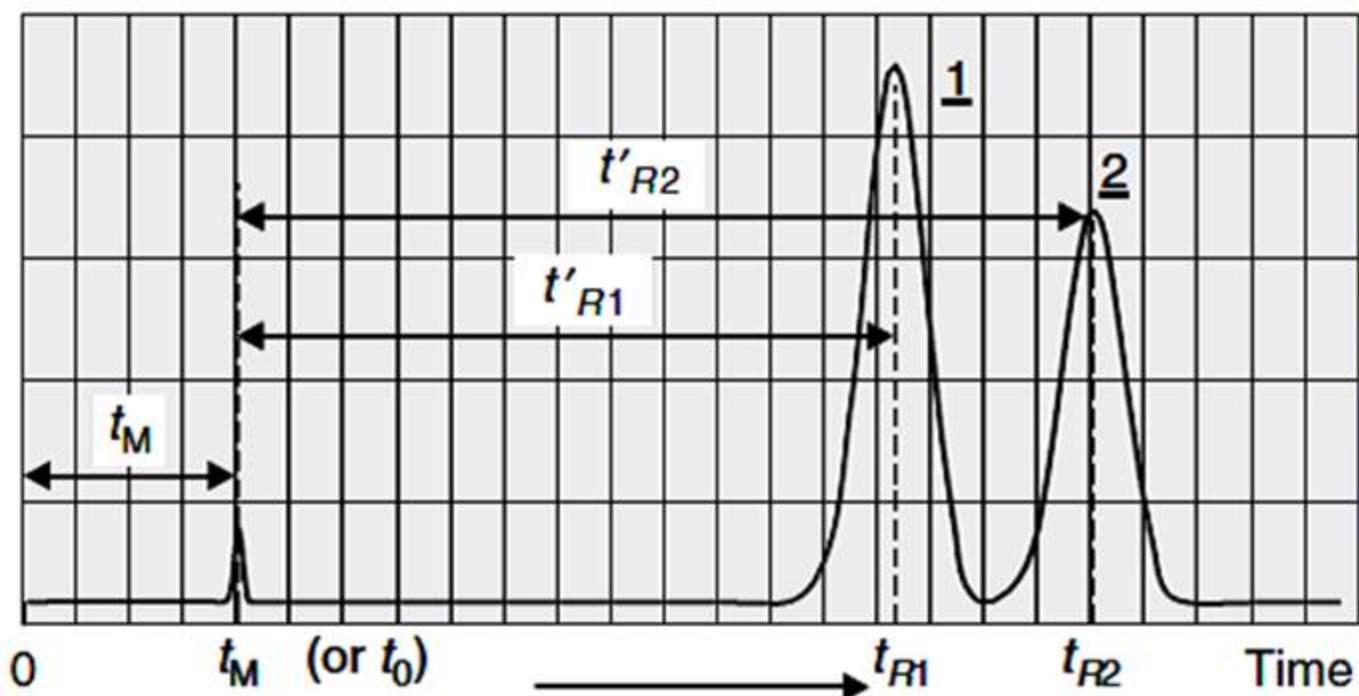
Sa vitesse moyenne sera 10 fois plus lente que si elle restait en permanence dans la phase mobile. Par conséquent si 20 mg de composé ont été introduits dans la colonne, il y aura en moyenne et en permanence 2 mg dans la phase mobile et 18 mg dans la phase stationnaire.

- **5. Facteur de séparation (ou sélectivité) entre deux solutés (α)**
- Le facteur de séparation α permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme (figure 3). Il est défini par les relations suivantes :

$$\alpha = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} \quad \text{ou}$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

Il ne peut, par définition, être inférieur à 1.



$$k_1 = \frac{t'_{R1}}{t_M}$$

$$k_1 = 3,08$$

$$k_2 = \frac{t'_{R2}}{t_M}$$

$$k_2 = 4$$

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

$$\alpha = 1,3$$

Figure 3 : Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents. Chaque composé a un facteur de rétention qui lui est propre. α à lui seul, ne permet pas de savoir si la séparation est réellement possible. Sur cette figure, le facteur de séparation est d'environ 1,3.

6. Facteur de résolution entre deux pics R

Dr Laib

Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution R :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2}$$

$$R = 1,177 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\delta_1 + \delta_2}$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2}$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2}$$

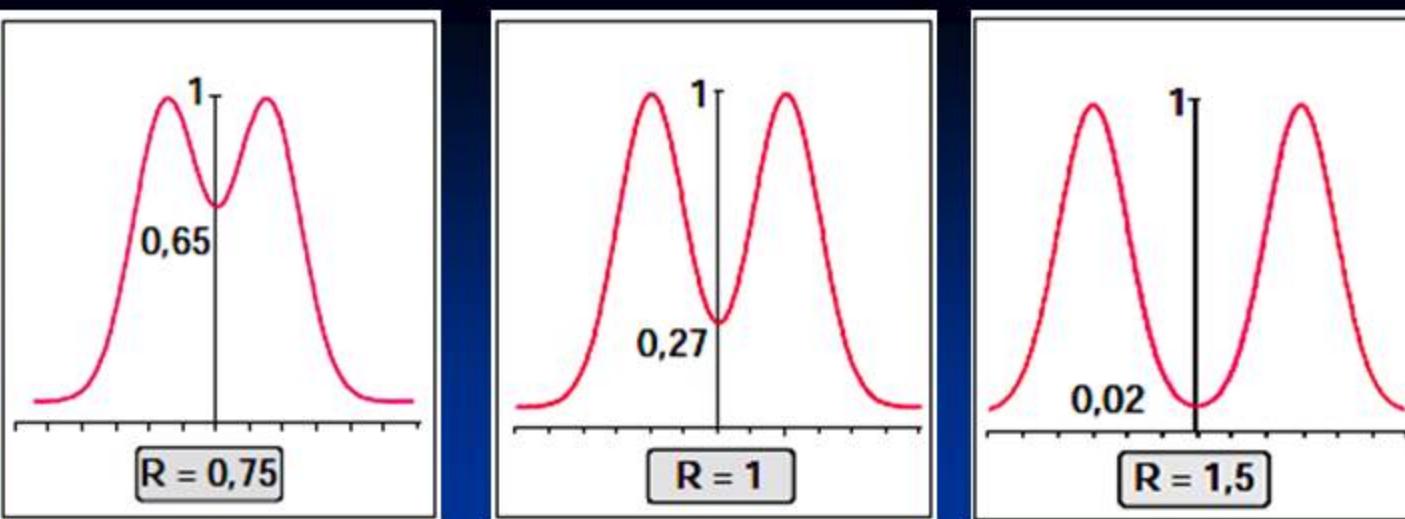


Figure 4 : Facteur de résolution.

Simulation de pics chromatographiques par juxtaposition plus ou moins rapprochée de 2 courbes gaussiennes identiques. Aspect visuel correspondant aux valeurs de R indiquées sur les diagrammes.

À partir de $R = 1,5$ on considère que les pics sont résolus, la vallée entre les pics étant d'environ 2 %.

Résolution

Dr Laib

Le succès d'une séparation chromatographique est jugé par la capacité du système à distinguer un pic d'analyte d'un autre. La résolution (R_s) est définie comme le rapport de la **différence de temps de rétention** (Δt_R) entre les **deux pics** (t_{RA} et t_{RB}) sur la **moyenne** (w_{av}) de leurs **largeurs de base** (w_A et w_B) :

$$R_S = \frac{\Delta t_R}{w_{av}} = \frac{2(t_{R_B} - t_{R_A})}{w_A + w_B} \quad (1)$$

Lorsque $R_S = 1.0$, la **séparation** des **deux pics** est **complète** à 97,7 % (le chevauchement est donc de 2,3 %). Lorsque $R_S = 1.5$, le chevauchement est réduit à 0,2 %. Les **pics non résolus** sont appelés **pics fusionnés**. La **Résolution** est influencée par l'efficacité de la colonne, les facteurs de sélectivité et les facteurs de rétention selon l'équation 1 :

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_{av}} \right) \quad (2)$$

Où k_2 est le **facteur de rétention** pour le **pic retenu le plus longtemps** et k_{av} est le **facteur moyen de rétention** pour les **deux analytes**. L'équation 2 est l'une des **plus importantes** dans la **chromatographie**, elle permet d'**améliorer** de la **résolution entre** les **analytes**. Par exemple, on peut voir que la **résolution augmente** avec \sqrt{N} .

Puisque **N** est lié à la **longueur** de la **colonne**, doubler la longueur de la **colonne augmentera** la **résolution** de $\sqrt{2}$, (**facteur** de 1,4) et n'est en général pas le **moyen préféré** pour **améliorer** la **résolution**. Étant donné que les **facteurs de rétention** et les **facteurs de sélectivité** sont liés aux **temps de rétention** et aux **volumes de rétention**, la **modification** de la **nature** des **deux phases** ou de leurs **volumes relatifs** aura un **impact** sur la **résolution**.

Les **facteurs de rétention** **dépendent** également des **coefficients de distribution**, qui à leur tour **dépendent** de la **température** ; par conséquent, la **modification** de la **température** de la **colonne** peut **améliorer** la **résolution**.

La **capacité** d'une **séparation chromatographique particulière** est une **mesure** de la **quantité** de **matière** qui peut être **résolue** en ses **composants** sans provoquer de **chevauchement** ou de **frontage** des **pics**. La **chromatographie échangeuse d'ions** a une **capacité élevée**, c'est pourquoi elle est **souvent utilisée** dans les **premières étapes** d'un **processus de purification**.

Exemple 1. Calcul de la résolution de deux analytes

Deux analytes A et B ont été séparés sur une colonne de **25 cm de long**. Les t_r observés étaient respectivement de **7 min 20 s** et **8 min 20 s**. La **largeur du pic de base** pour l'analyte B était de **10 s**. Lorsqu'un **composé de référence, complètement exclu de la phase stationnaire dans les mêmes conditions d'élution**, a été étudié, son t_m était de **1 min 20 s**.

Quelle était la **résolution des deux analytes** ?

Réponse

Afin de calculer la **résolution** requise, il faut d'abord calculer d'autres paramètres chromatographiques.

(i). Temps de rétention réduit (ajusté) (t'_R) :

Le **temps de rétention réduit (ajusté)** pour **A** et **B** basé sur l'**équation 1** :

$$\underline{t'_R} = \underline{t_R} - \underline{t_M}$$

Pour l'analyte **A** (t'_R) = 440 - 80 = 360 s ;

Pour l'analyte **B** (t'_R) = 500 - 80 = 420 s.

(ii). Facteur de Sélectivité (k) :

Le **facteur de rétention** pour **A** et **B** basé sur l'équation 2 :

$$\underline{k} = \underline{t_R} / \underline{t_M}$$

Pour l'analyte **A** : $k_A = 360/80 = 4,5$;

Pour l'analyte **B** : $k_B = 420/80 = 5,25$.

(iii). Facteur de sélectivité (α) :

Le facteur de sélectivité pour les deux analytes basé sur l'équation 3 :

$$\underline{\alpha = k_B/k_A}$$

$$\alpha = 5,25/4,5 = 1,167.$$

(iv) . Nombre de plateaux théoriques (N) :

Le nombre de plateaux théoriques dans la colonne ; basé sur l'équation 4 :

$$\underline{N = (t_R/\omega)^2 \text{ for analyte B}}$$

$$N = (420 / 10)^2 = 1764.$$

(v). La resolution (R_s) :

La résolution des deux analytes basée sur l'équation 2 :

$$R_s = (\sqrt{N}/4)[(a-1)/\alpha] (k'_B/(1 + k_{av}))$$

Donne :

$$R_s = (\sqrt{1764}/4) (0,167/1,167) (5,25/1 + 4,875) = 1,34.$$

Discussion

Dr Laib

D'après la discussion précédente sur la **résolution**, il est évident qu'une **résolution** = 1,34 donne une **séparation** des **pics supérieure** à 99 %. S'il était nécessaire d'**augmenter** cette **séparation**, il serait possible de **calculer** la **longueur** de la **colonne nécessaire** pour **doubler** la **résolution**. La **résolution** est **proportionnelle** à la **racine carrée** de **N**, pour **doubler** la **résolution**, le **nombre** de **plateaux théoriques** dans la **colonne** doit être **multiplié** par 4 = $4 \times 1764 = 7056$.

La hauteur des plateaux dans la colonne $H = L/N$:

$$250/1764 = 0,14 \text{ mm.}$$

Pour **obtenir 7056 plateaux** dans la colonne, sa

longueur doit être **augmentée** à $0,14 \times 7056 = 987,84$

mm ou **98,78 cm.**

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 -----

18:0 -----

18:1 -----

18:2 -----

18:1 -----

18:3 -----

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>Dr Laib</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-Eicosatetraenoic 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** *Dr Laib*
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 carbone (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,

certains 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 $\omega 3$) et tous les **cis 4,7,10,13,16,19**. L'ester méthylique de l'acide **docosahexénoïque** (DHA, C22:6 $\omega 3$) 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.

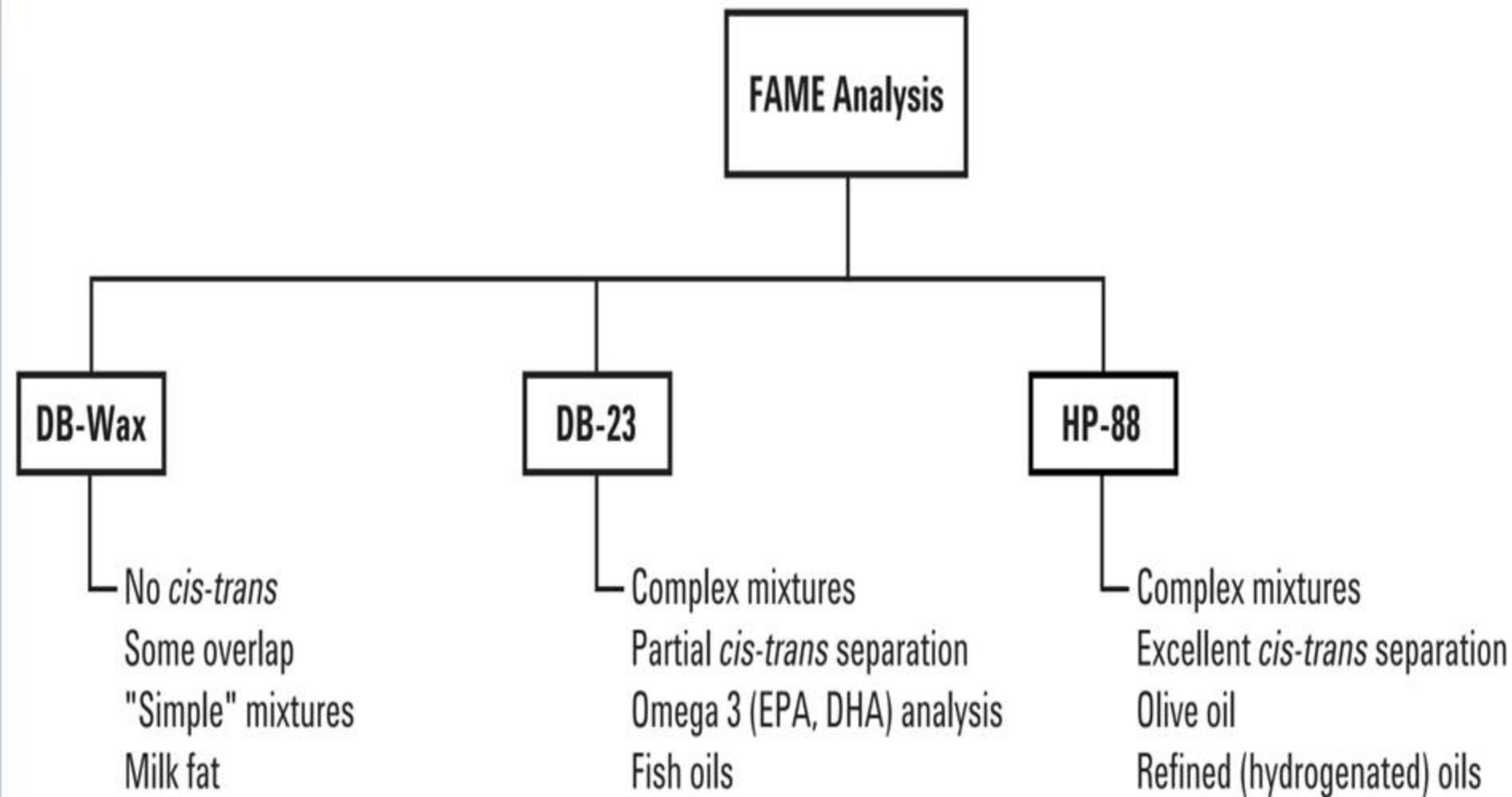
Dissoudre l'échantillon dans 10 ml d'hexane. Ajouter 100 µL d'hydroxyde de potassium 2 N dans le méthanol (11,2 g dans 100 ml). Fermez le tube ou le flacon et vortexez pendant 30 s. Centrifuger. Transférez le surnageant clair dans un flacon d'échantillonneur automatique de 2 mL.

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).

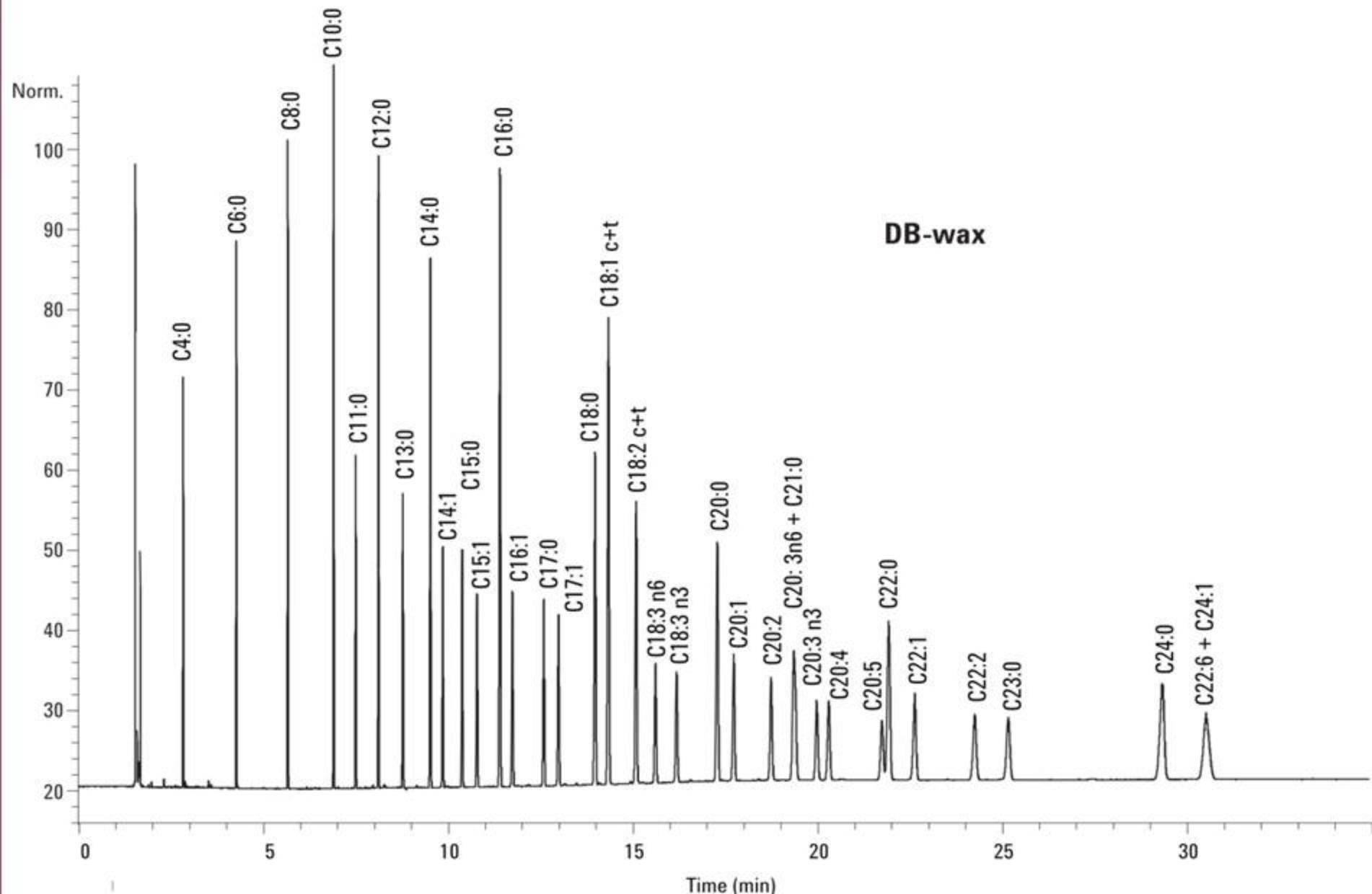


1. Colonne DB-Wax

Table 2. DB-Wax Method 1*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 : 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm DB-Wax (J&W 122-7032)****Experimental Conditions GC-FID****Inlet temperature : 250 °C****Injection volume : 1 µL****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

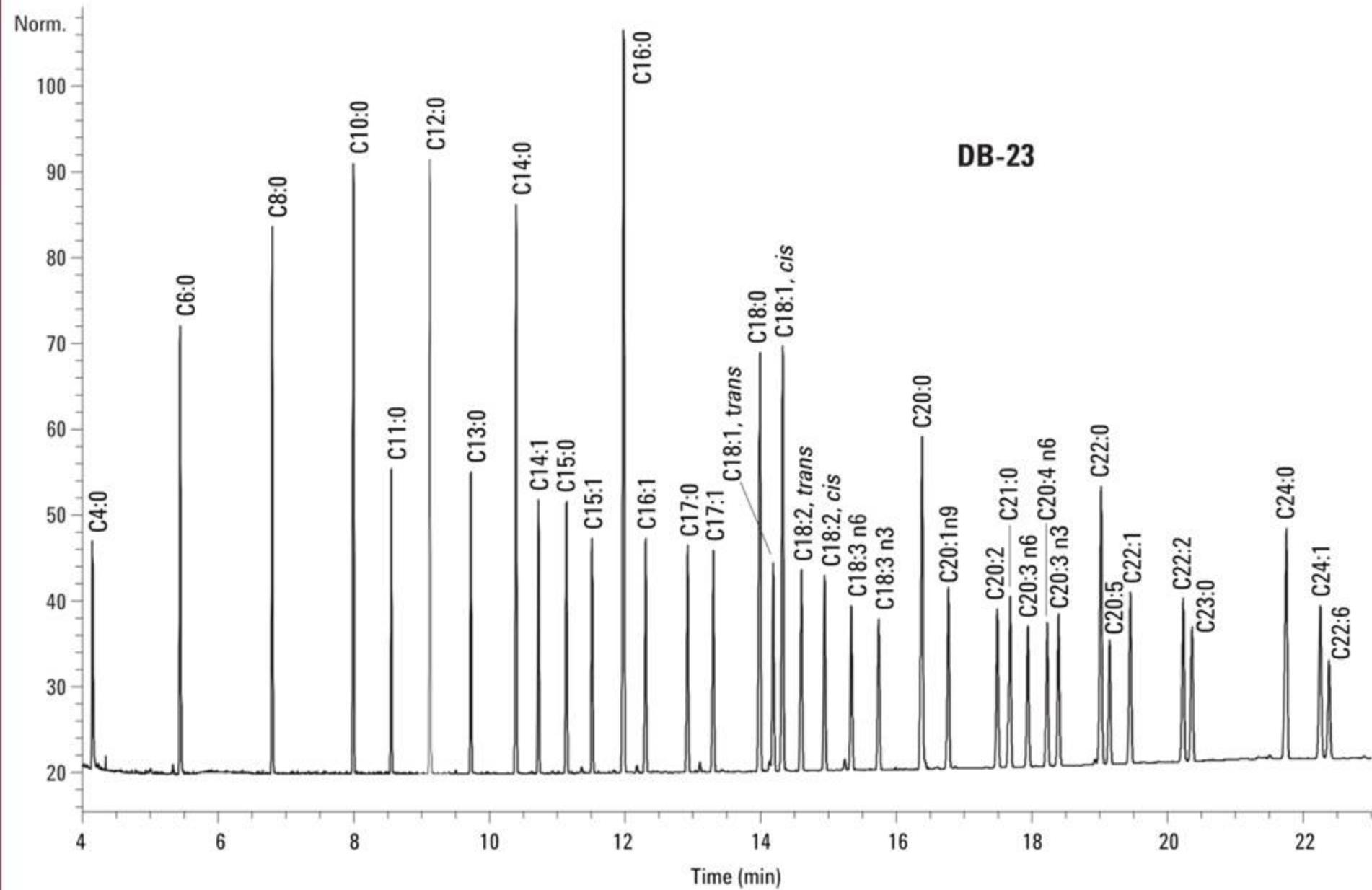


1. Colonne DB-23

Table 3. DB-23 Method 2*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** : 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

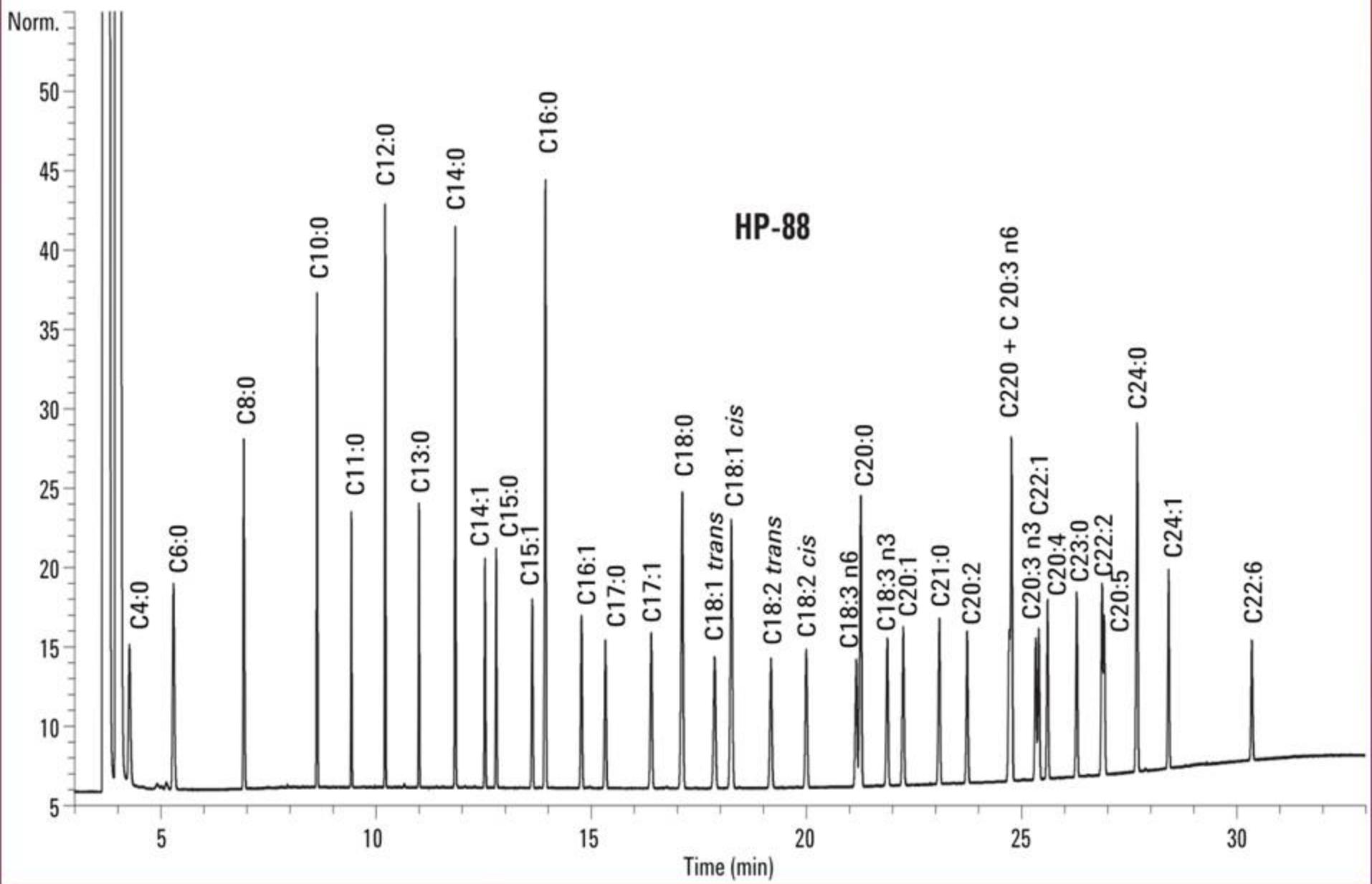
Table 4. HP-88 Methods 3A and 3B*Dr Laib***Instrumentation****Chromatographic system : Agilent 6890 GC****Inlet :** Split/Splitless**Detector :** FID or Agilent 5973 MSD**Automatic Sampler :** Agilent 7683**Liner :** Split liner (p/n 5183-4647)**Column A :** 100 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 (J&W 112-88A7)**Column 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

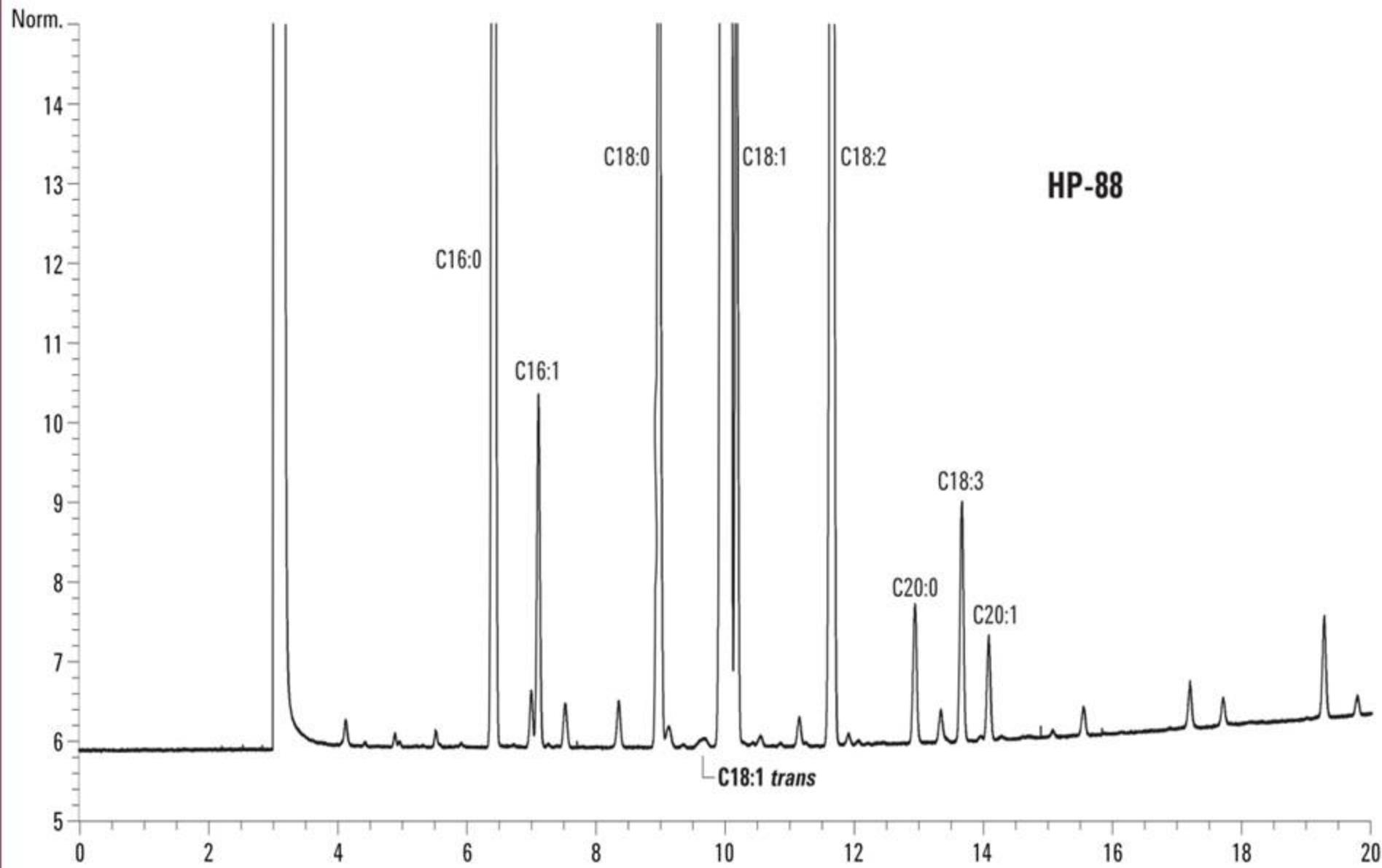
Colonne HP-88

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.

Electrophorèse

Principe : La séparation des particules se fait en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille, les **facteurs** qui influent sur le procédé sont :

- Temps de migration ;
- Force ionique du tampon ;
- Température ;
- Courant électrique continu ;
- Forces de freinage ;
- pH du tampon (important si substances amphotères).

1. Électrophorèse de zones

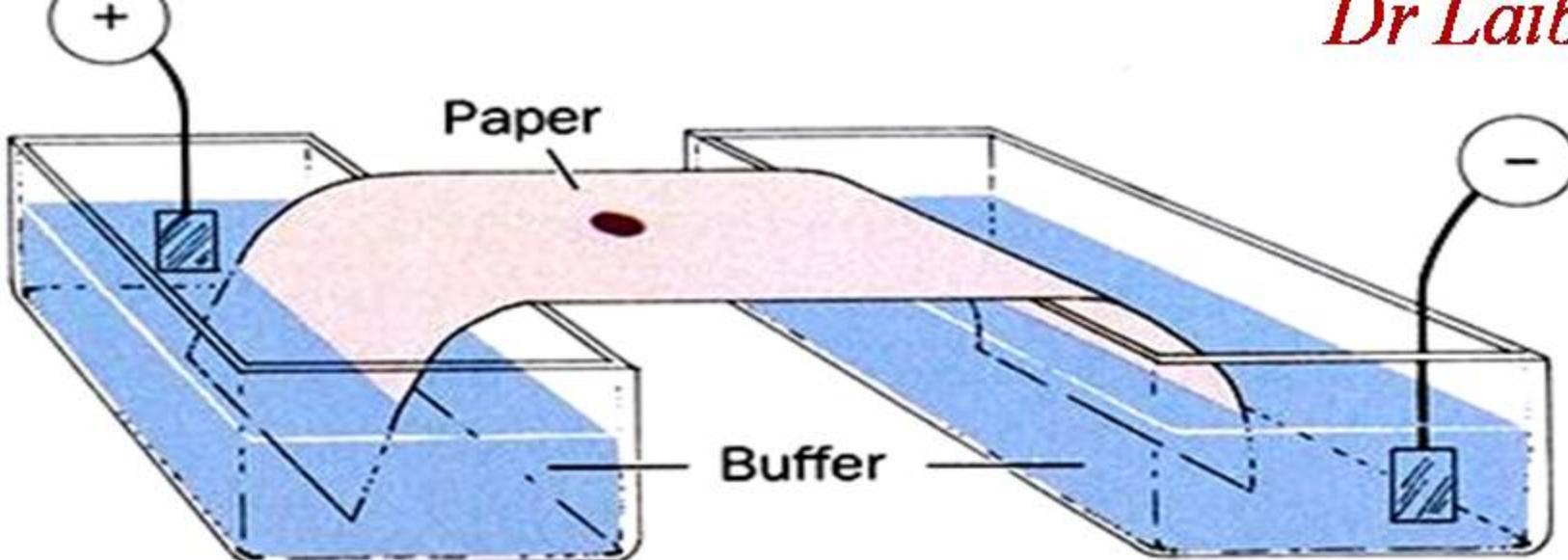
L'électrophorèse de zones ou électrophorèse sur support

permet de stabiliser la phase liquide grâce à l'utilisation d'un support poreux imprégné d'un solvant tamponné.

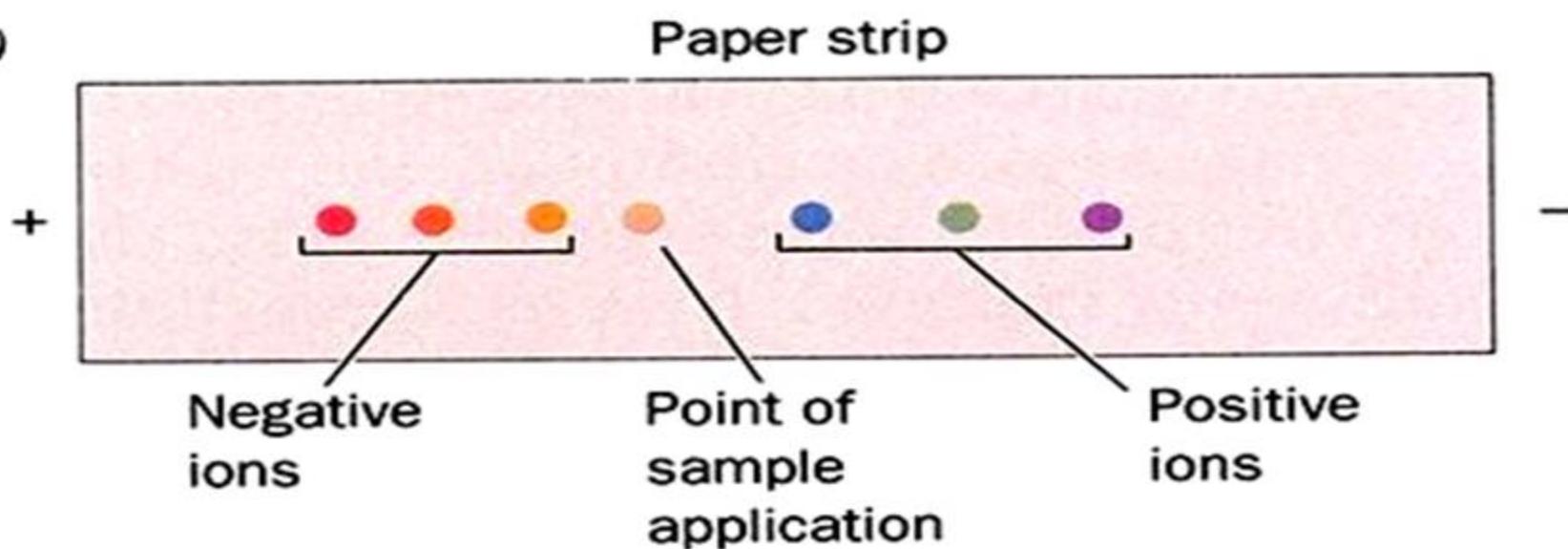
Différents supports d'électrophorèse de zones

Le **support** doit être homogène, poreux et inerte :

- ❖ Papier (**bande**)
- ❖ Acétate de cellulose (**bande**)
- ❖ Semi-solide (**gels** : de **polyacrylamide**, **d'agarose**, **d'amidon**, **de silice**, ...) (**tube**)



(b)



- Milieu **basique** : protéines chargées (-) ;
- **Vitesse de migration dépend** : **magnitude de la charge + taille molécules** ;
- **Intensité de la coloration** est **proportionnelle** à la **concentration en protéines**.

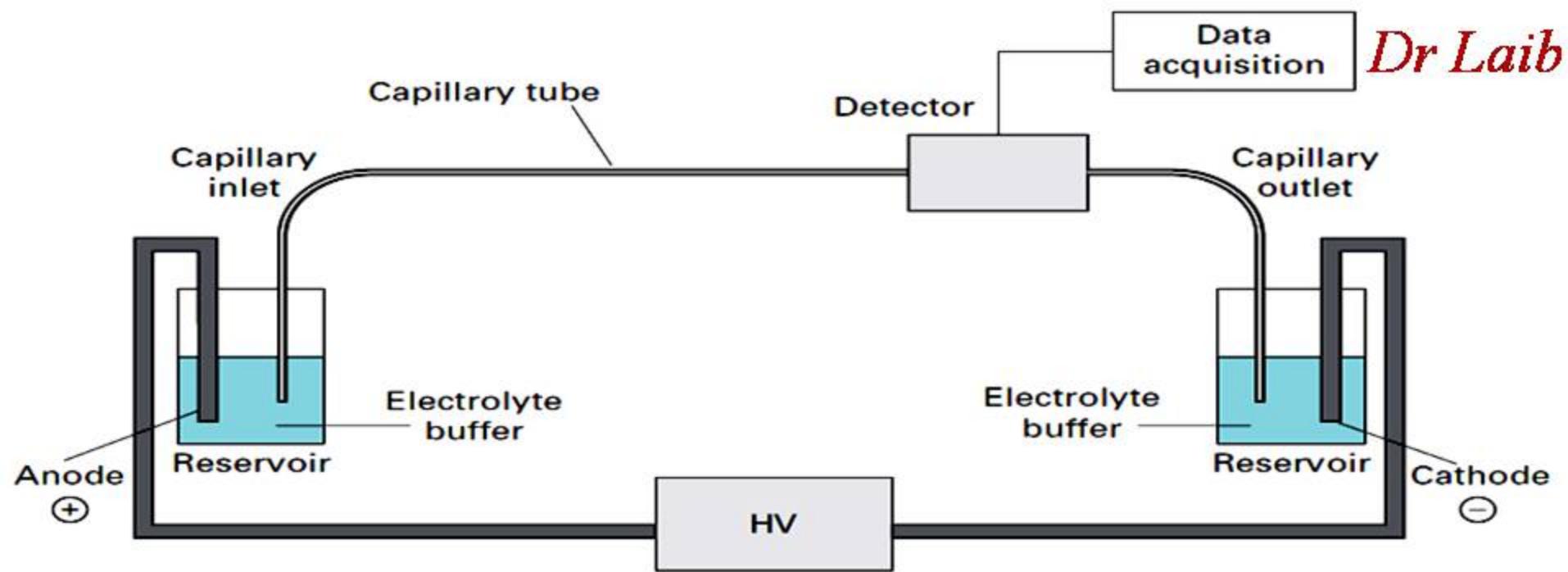
■ 2. Électrophorèse capillaire

Séparation d'espèces ioniques dans un tube capillaire (10 100 µm diamètre) rempli d'un électrolyte conduisant le courant à l'intérieur du capillaire : Voltage élevé (15-30 kV)
= **migration très rapide dans le capillaire.**

Injection échantillon Quelques nL d'échantillon.

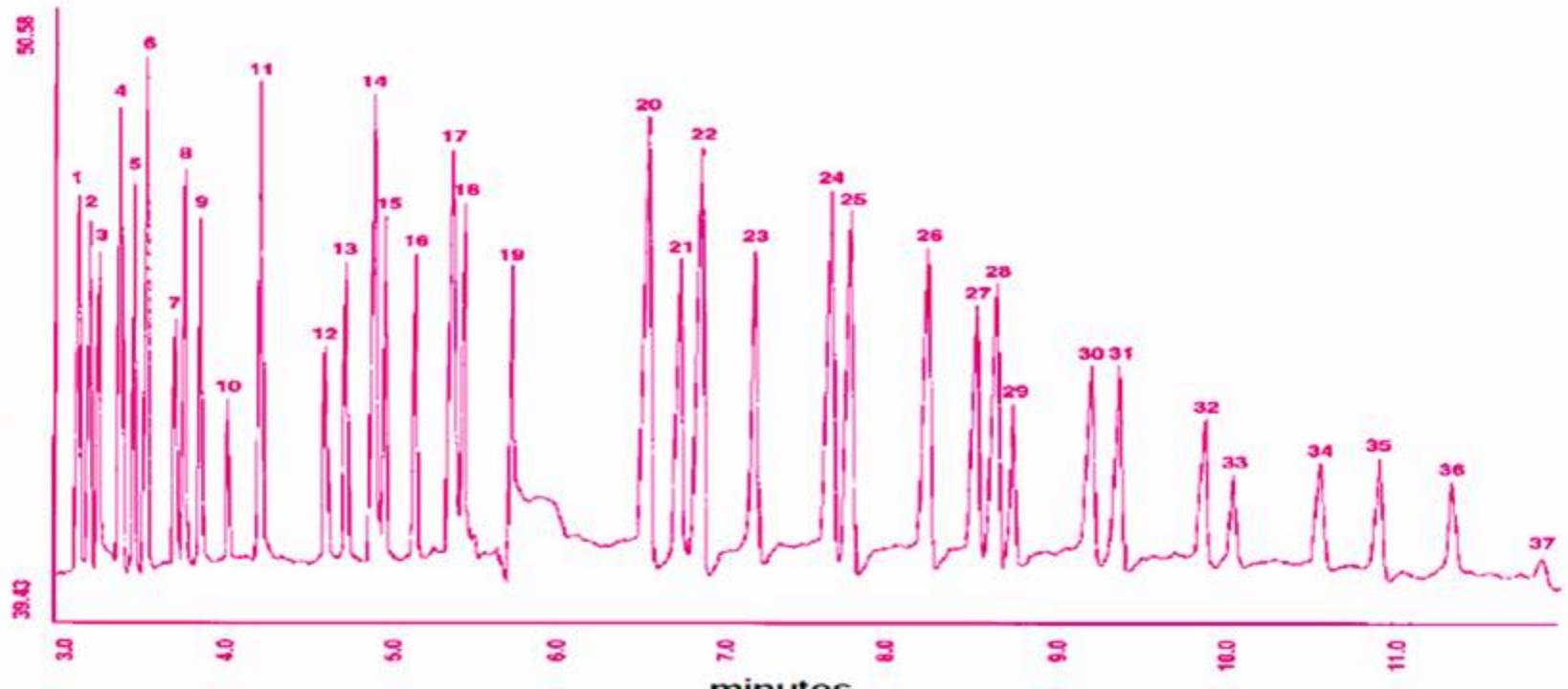
Technique : Rapide, haute résolution, très sensible et automatisable.

Temps d'analyses : Très courts



anions :

- 1 bromure
- 2 chlorure
- 3 ferrocyanure
- 4 nitrite
- 5 nitrate
- 6 sulfate
- 7 azoture
- 8 oxalate
- 9 molybdate
- 10 tungstate
- 12 fluorure
- 13 tartrate
- 16 phosphate
- 17 citraconate
- 19 carbonate
- 20 acetate
- 24 propionate
- 26 crotonate
- 28 butyrate
- 31 valerate
- 33 caproate
- 37 gluconate

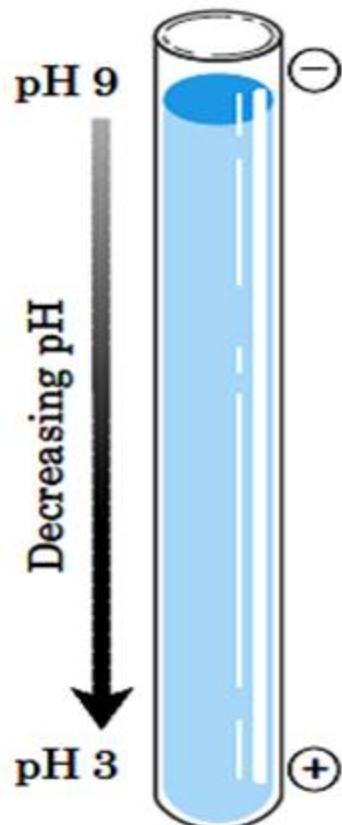


3. Electrofocalisation

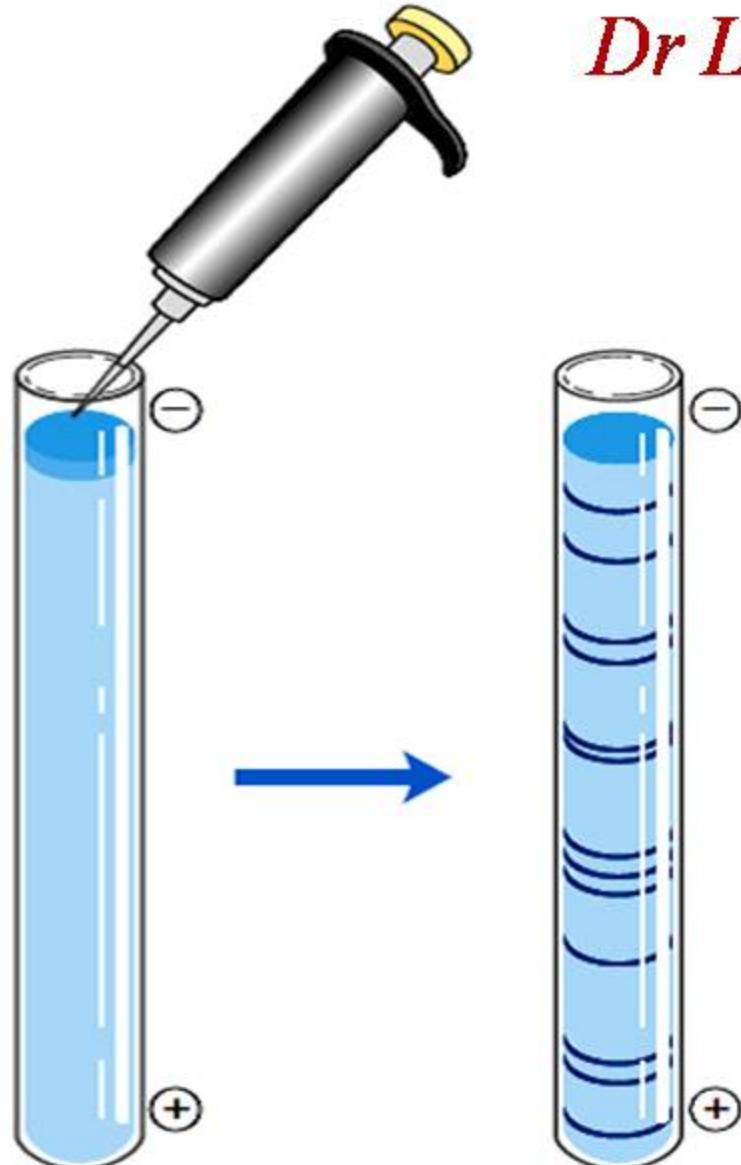
La migration est effectuée dans un gradient de pH; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH = son pH_i. On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration.

Le gradient de pH est généré par des ampholytes : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pH_i dans une certaine gamme (gamme large : 3-9, ou plus au moins étroite : 4-5 ou 5-6.5). Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle.

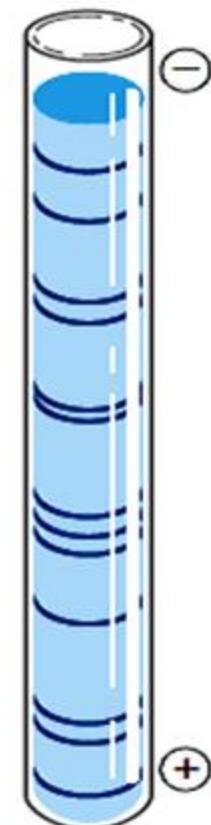
An ampholyte solution is incorporated into a gel.



A stable pH gradient is established in the gel after application of an electric field.



Protein solution is added and electric field is reapplied.



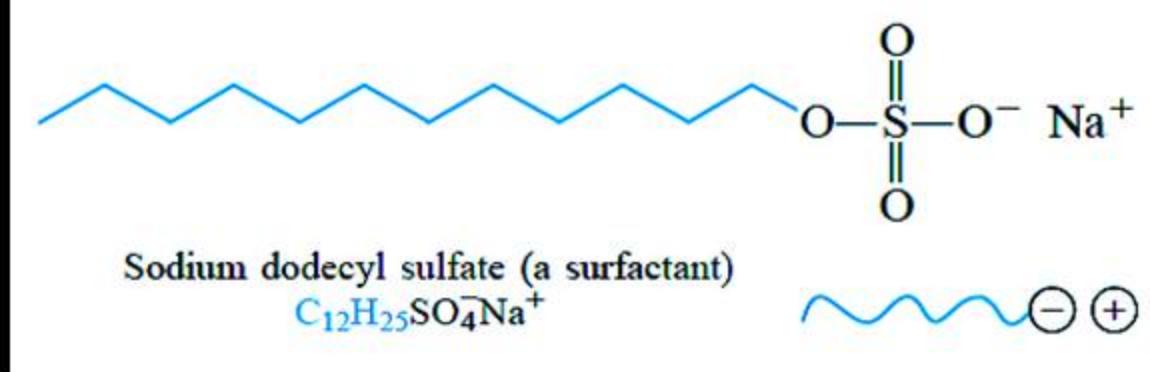
After staining, proteins are shown to be distributed along pH gradient according to their pI values.

4. Électrophorèse sur gel polyacrylamide

L'électrophorèse PAGE a tendance à remplacer celle sur acétate de cellulose.

Pour séparer les protéines, on utilise le plus souvent une électrophorèse particulière réalisée en conditions dénaturante (SDS-PAGE).

SDS Sodium Dodécyl Sulfate ($C_{12}H_{25}SO_4^-$) détergent anionique.



Suppression des facteurs forme et charge lors de la migration : Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur taille.

Gel de séparation ou de résolution (Ranning gel : 6-15 % polyacrylamide) contenant du SDS ;

Gel concentrateur (Stacking gel : 3 à 5 %); coulé en haut du gel de séparation.

Protéine monomérique



SDS
beta-mercptoéthanol



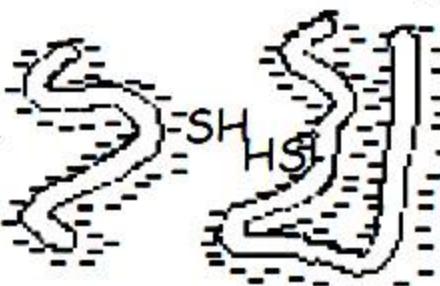
dénaturation

enrobe les protéines de charges (-)
rupture des ponts di-sulfures

Protéine multimérique



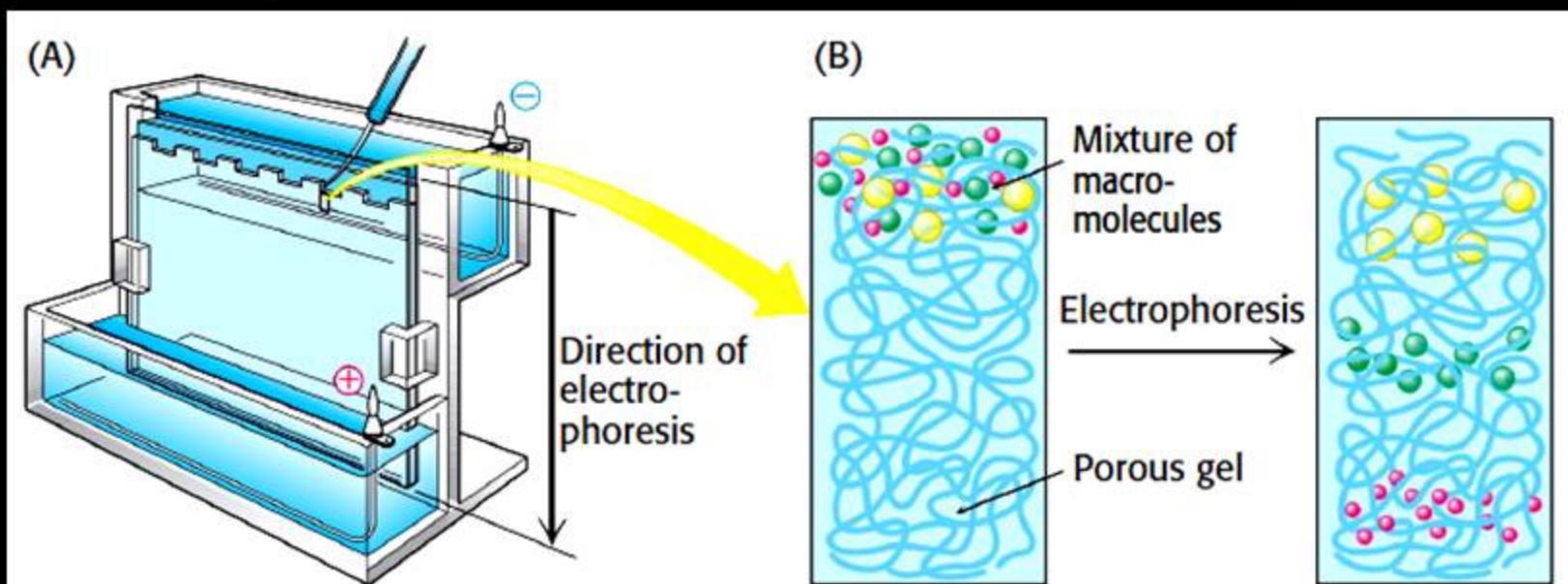
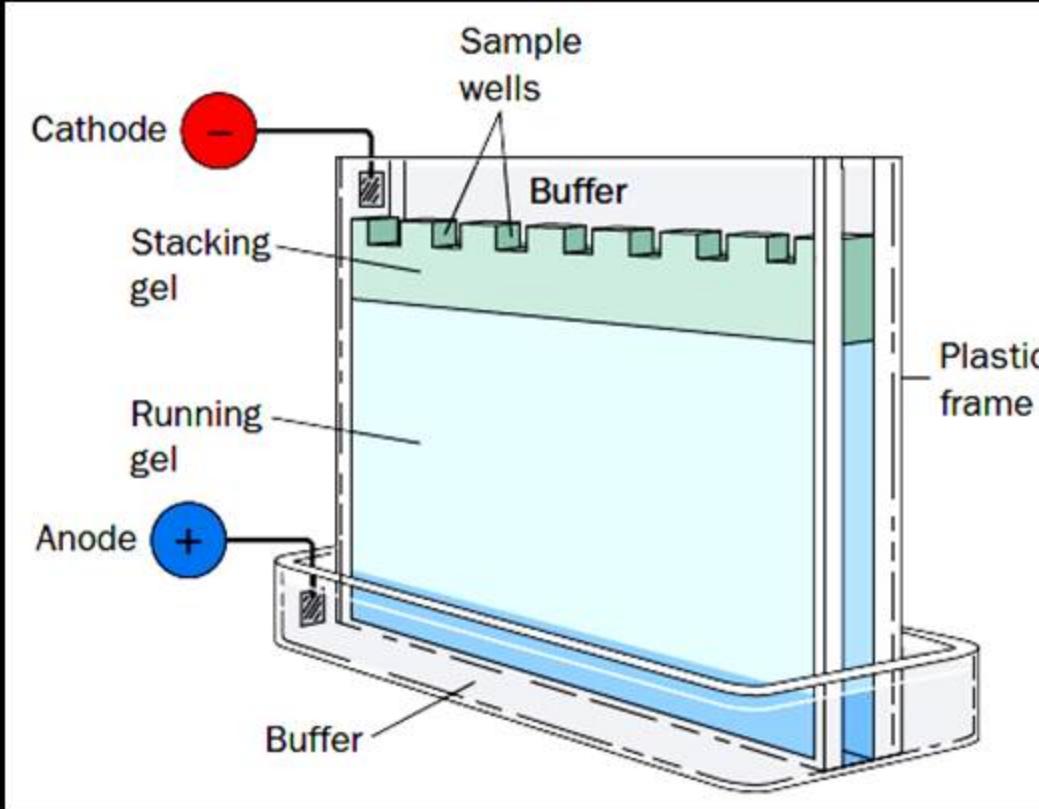
SDS
beta -
mercptoéthanol



■ Les extraits protéiques mis à bouillir en présence d'un

détergent et d'un agent réducteur;

■ Perte de la charge nette et de la structure tertiaire ou quaternaire



Évaluation des masses moléculaires (M) des protéines (Da)

séparées, on utilise des standards ;

Les protéines séparées dans le gel : coloration au bleu de Coomassie, nitrate d'argent (plus sensible), ou nouveaux colorants fluorescents.

Stain	Compound
Amido black 10 B	Proteins
Coomassie blue	Proteins
Silver nitrate	Proteins
Ethidium bromide	DNA and RNA
Sudan black	Lipids and lipoprotein
Schiff-periodic acid	Carbohydrate and glucoprotein
Ninhydrin	Amino acids

5. Électrophorèse bi-dimensionnelle

Lorsqu'il existe des bandes protéiques très proches =>

chevauchement donc Séparation par électrophorèse SDS

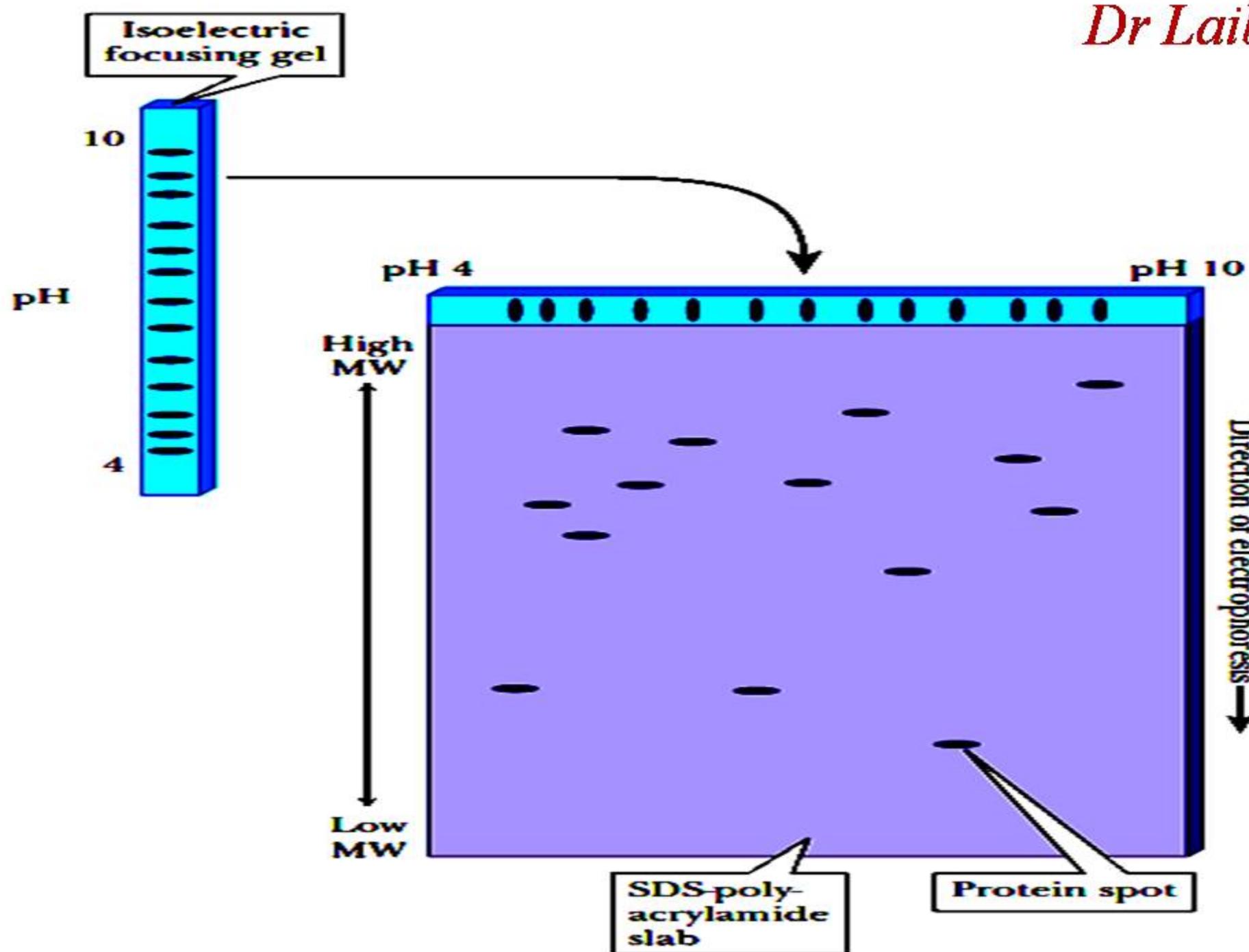
PAGE (Unidimensionnelle): Résolution < 50 protéines

Pour séparer plus de bandes = Électrophorèse bi

dimensionnelle donc Résolution > 1000 protéines

différentes.

- **Dimension 1 : Séparation des protéines en fonction de la charge par Focalisation Isoélectrique (FIE).**
- **Valeur de pH_i spécifique d'une protéine, qui ne migre plus dans un champ électrique.**
- **On réalise une électrophorèse dans un tube étroit de gel polyacrylamide où un gradient de pH est établi.**
Dimension 2 : Séparation en fonction de la taille des protéines : SDS-PAGE.



Le spectre électromagnétique de la lumière

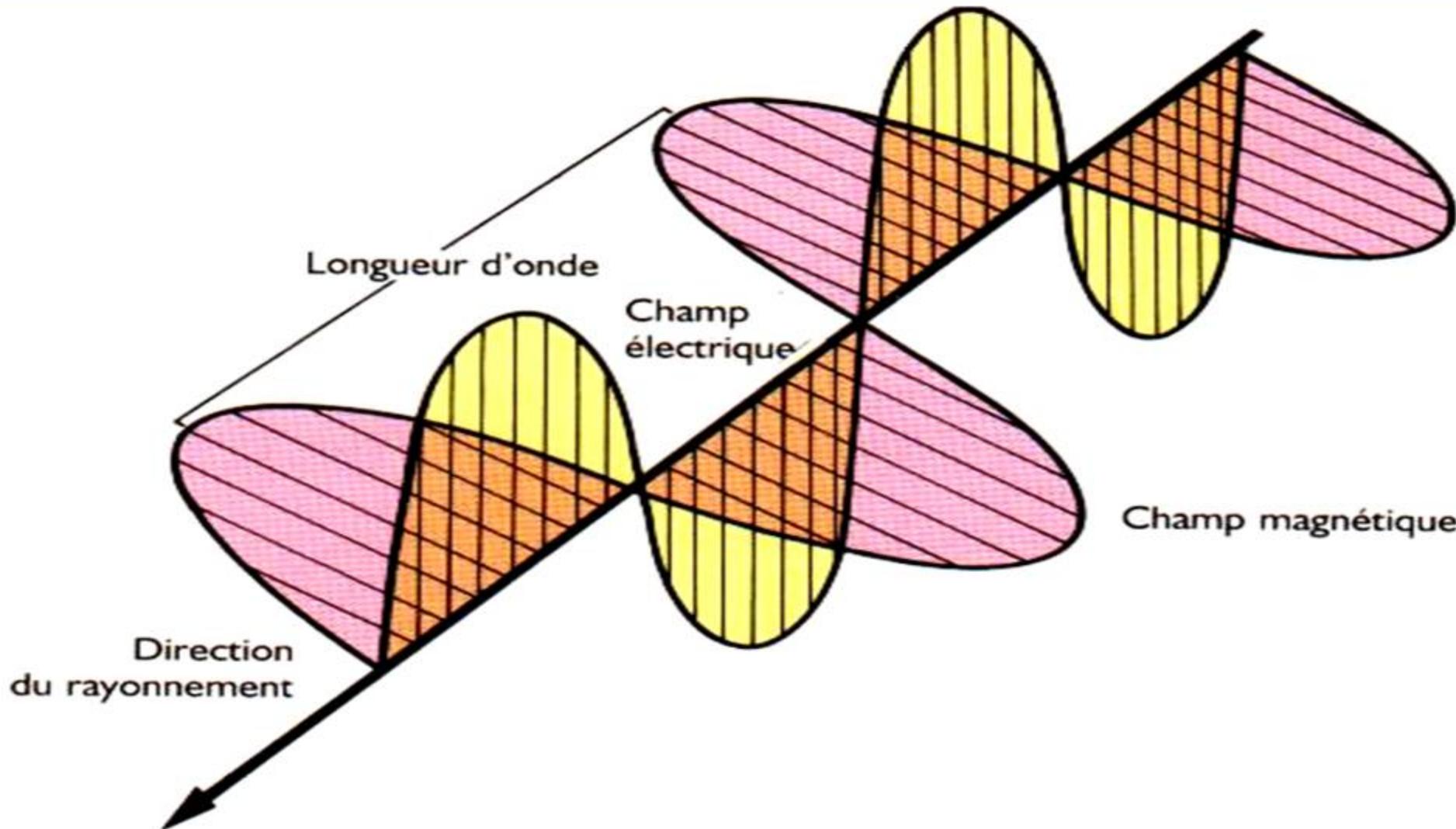
La lumière visible n'est qu'une petite partie de ce qu'on appelle aujourd'hui le spectre électromagnétique.

La lumière possédait une longueur d'onde, celle-ci détermine la couleur. Le tableau ci-dessous indique les longueurs d'ondes visibles à l'œil nu.

L'œil humain n'est sensible à la lumière que dans l'intervalle de longueurs d'onde compris entre **400 nm** et **700 nm**.

Couleur	Longueur d'onde (nm)	<i>Dr Laib</i>
Rouge	700	
Orange	650	
Jaune	600	
Vert	550	
Bleu	500	
Violet	450	

Maxwell en conclut que la lumière est
une onde électromagnétique



Les différentes **régions** du **spectre** se caractérisent par la longueur des ondes (λ), mais aussi par leur **fréquence**

(ν), définie comme le **nombre d'oscillations** qui passent par un **point donné** en une **seconde**.

L'unité de fréquence est le hertz ; $1 \text{ Hz} = 1 \text{ oscillation par secondes.}$

Une radiation électromagnétique est caractérisée par sa fréquence ν en hertz Hz, s^{-1} qui définit l'énergie Transportée par les photons :

$$E = h \cdot \nu$$

h : est la constante de Planck $h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s .

λ : la longueur d'onde qui présente la distance parcourue par l'onde pendant une période T.

$$\lambda = C \cdot T = C/v$$

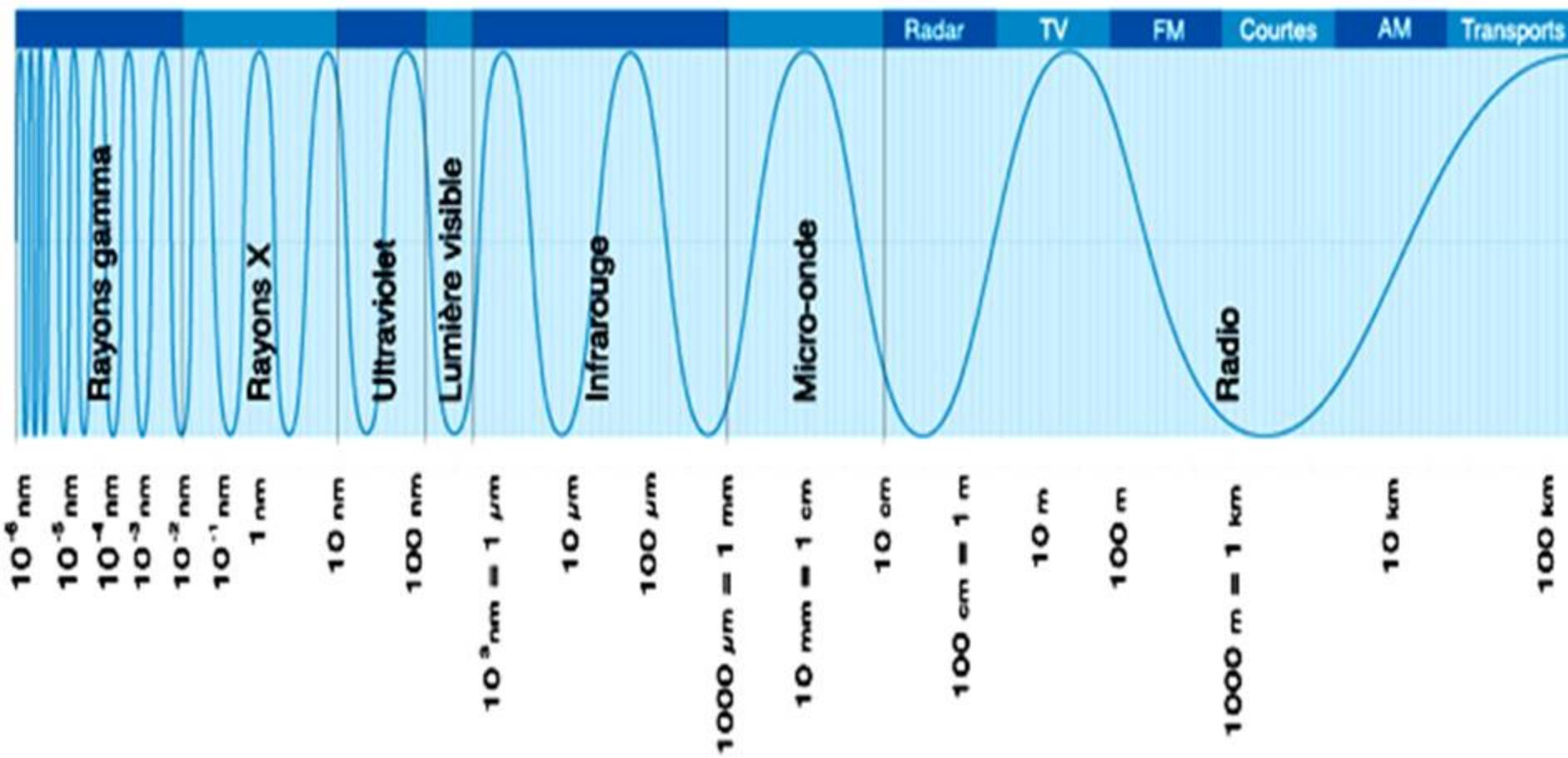
T : la **période** est l'**inverse** de la **fréquence** exprimée en **seconde** ;

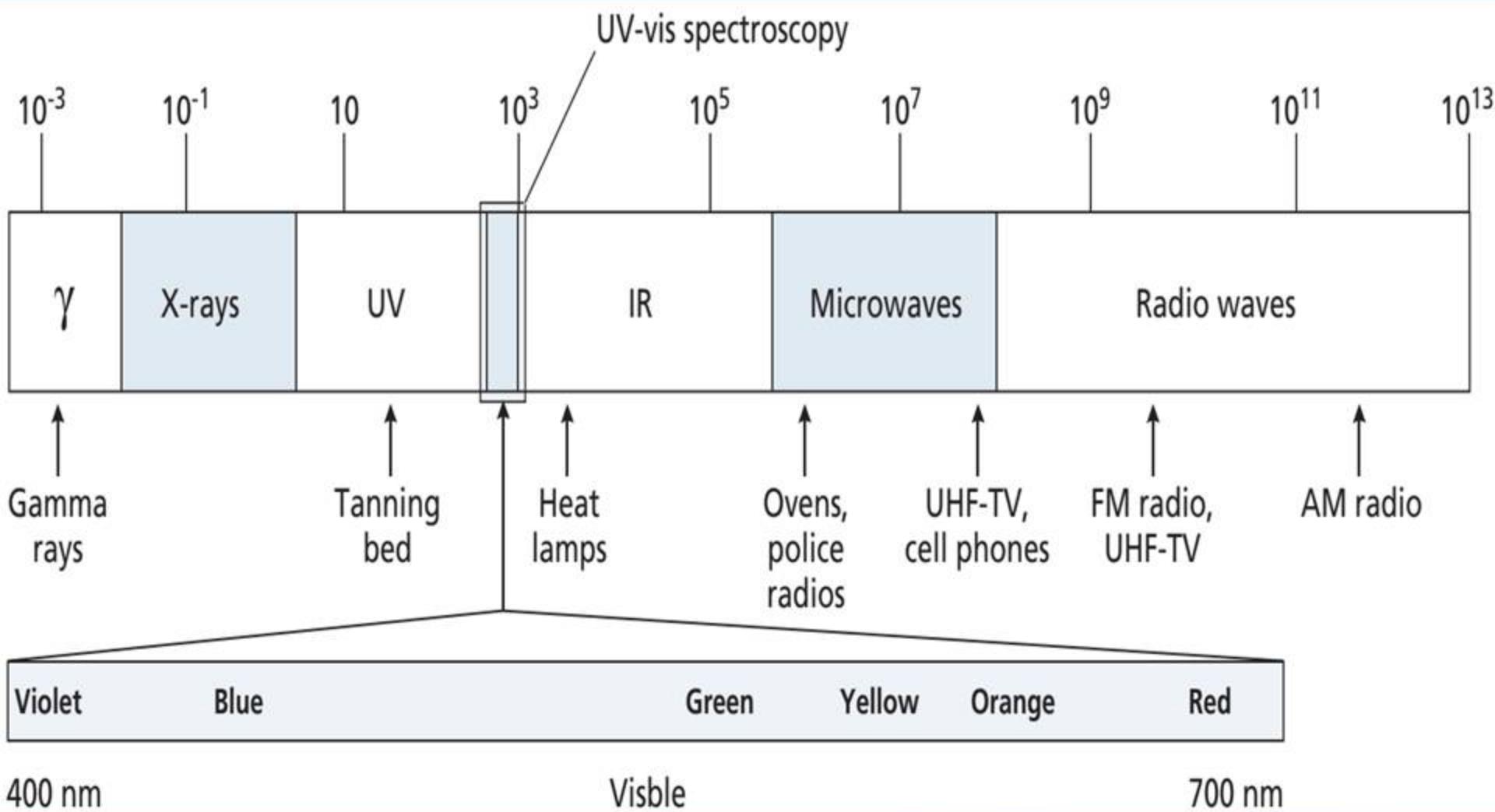
$$(v = 1/T).$$

C : représente la **célérité** de la lumière dans le **vide** ;

$$(C = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}).$$

Plus la **longueur d'onde** est **petite**, plus les **oscillations** sont **rapprochées**, et plus la **fréquence** est **grande** (on parle alors de **haute fréquence**). La **fréquence** est donc **inversement proportionnelle** à la **longueur d'onde**.





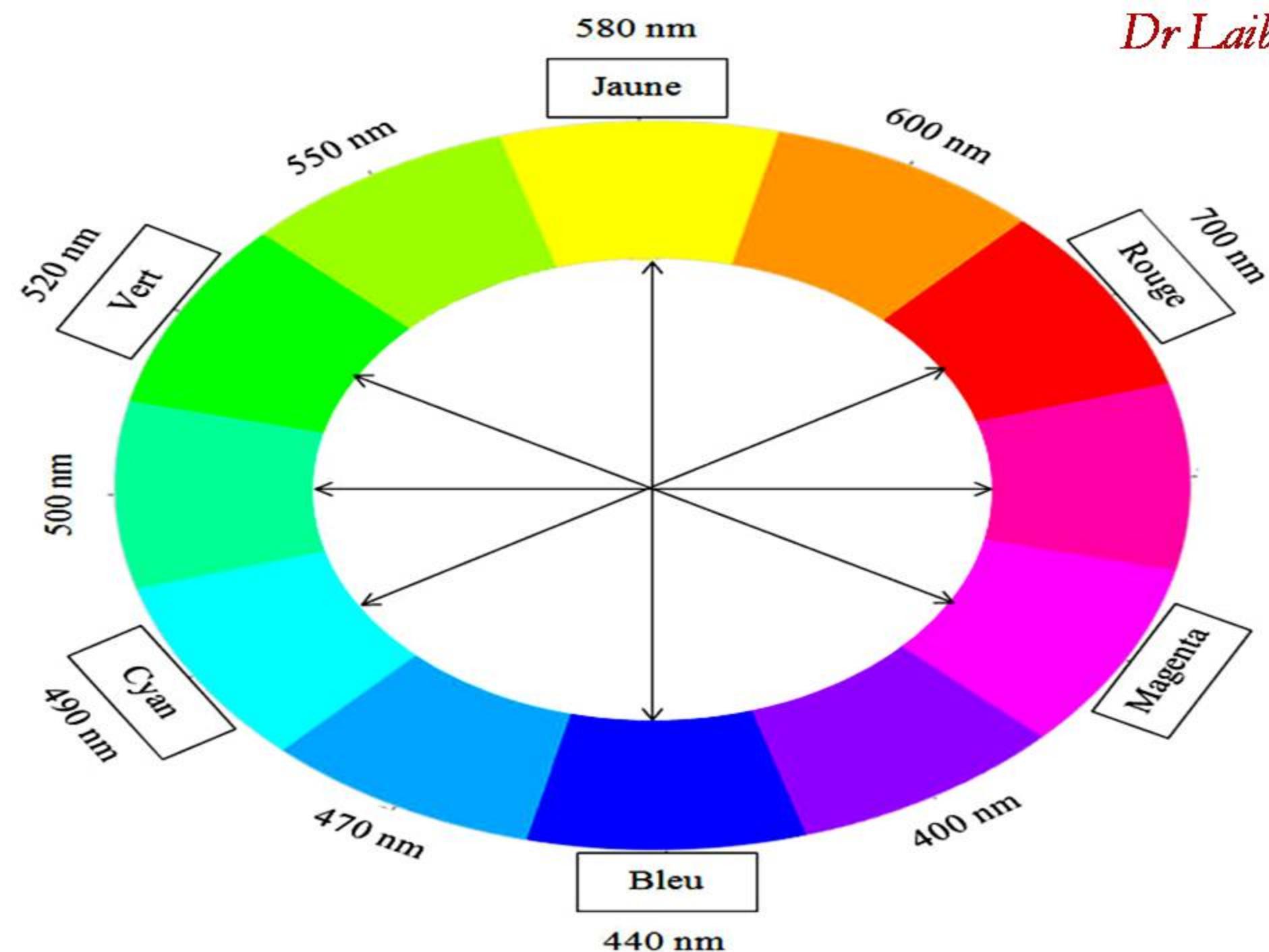
Un aperçu de spectre électromagnétique (nm)

Spectrophotométrie

UV-visible

Une solution colorée absorbe certaines longueurs d'onde et la couleur de la solution perçue par l'œil correspond à la couleur complémentaire de celle qui est absorbée par la solution.

Exemple : Une substance qui apparaît jaune absorbe dans le bleu.



Longueurs d'ondes Absorbées (nm)	Couleur « absorbée » par le corps	Couleur complémentaire
400-435	Violet	Vert-jaunâtre
435-480	Bleu	Jaune
480-490	Bleu-verdâtre	Orange
490-500	Vert-bleuâtre	Rouge
510-560	Vert	Pourpre
560-580	Vert-jaunâtre	Violet
580-595	Jaune	Bleu
595-610	Orange	Bleu-verdâtre
610-750	Rouge	Vert-bleuâtre

1. Les spectres d'absorption UV-visible

- Domaine de longueur d'onde

UV : 10 nm à 400 nm

Visible : 400 nm à 800 nm

- Sources

UV : Lampe à deutérium

Visible : Lampe à incandescence.

2. Loi de Beer-Lambert

- La **loi de Beer-Lambert** est une relation **empirique** reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux qu'elle traverse.
- La **loi de Beer-Lambert** établit une **proportionnalité** entre la concentration d'une solution chimique, l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution.

3. Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de **Beer-Lambert** n'est cependant **valable** que sous certaines conditions :

- La **lumière** doit être **monochromatique** ;
- La **[solutions]** doit être **faible** (de l'ordre de 10^{-4} mol.L⁻¹) ;
- Les solutions doivent être **homogènes** ;
- Le soluté **ne doit pas réagir** sous l'action de la **lumière incidente**.

L'absorption d'un faisceau de lumière monochromatique dans un milieu **homogène et isotrope** est **proportionnelle** à la longueur du trajet optique suivi par cette radiation et la concentration des espèces absorbantes en solution.

4. Grandeurs spectrophotométriques

Dr Laib

La loi de **Beer-Lambert** peut s'exprimer ainsi :

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon l C}$$

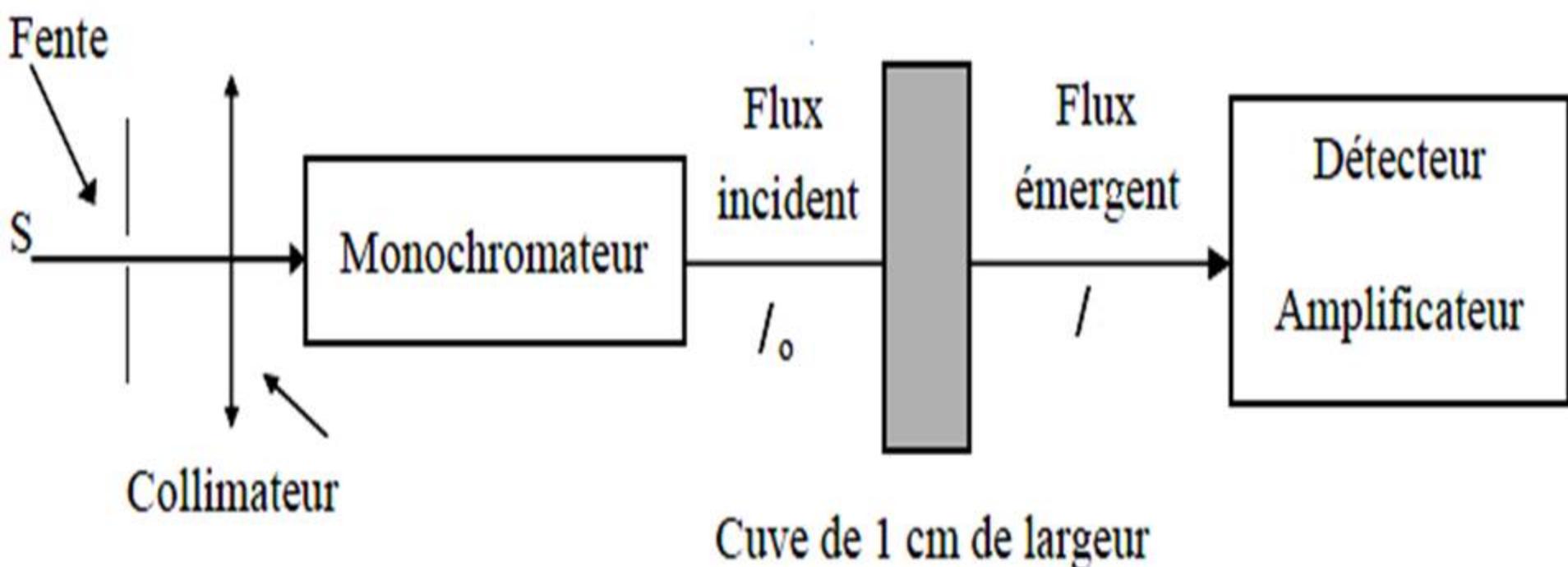
Ou encore :

$$A_\lambda = - \log I/I_0 = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C$$

- I_0 : est l'intensité de la lumière incidente (en Candela) ;
- I : est l'intensité de la lumière sortante (en Candela) ;
- I_0/I est l'Opacité de la solution (O) (sans unité) ;
- I/I_0 est la transmittance de la solution (T) (en %) ;
- A est l'absorbance ou densité optique à une longueur d'onde λ (sans unité) ;

- ϵ est l'absorptivité molaire (coefficients d'extinction molaire), (en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Elle dépend de la longueur d'onde, de la nature chimique de l'entité et de la température ;
- ℓ est la longueur du trajet optique dans la solution traversée, elle correspond à l'épaisseur de la cuvette utilisée (en cm) ;
- C est la concentration molaire de la solution (en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

5. Principe du spectrophotomètre



2.5. Applications de la loi de Beer-lambert

Cette loi est utilisée pour de nombreux dosages d'espèces chimiques colorés. Pour des composés incolores, il est parfois possible de fabriquer des complexes colorés. Cette loi n'est valable que pour les faibles concentrations est en général pour des absorbances inférieures à 1.

La loi de Beer-lambert est également utilisée dans certains détecteurs comme ceux utilisés en HPLC.

Biomolécules

Table 1.
Standard
Amino Acids
of Proteins
(Grisham and
Garrett, 2017)

Name, Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula ^a	Residue Mass (D) ^b	Average Occurrence in Proteins (%) ^c	pK ₁ α-COOH ^d	pK ₂ α-NH ₃ ⁺ ^d	pK _R Side Chain ^d
Amino acids with nonpolar side chains						
Glycine Gly G	 A structural formula of glycine showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and an oxygen atom. The alpha-carbon is highlighted in red.	57.0	7.1	2.35	9.78	
Alanine Ala A	 A structural formula of alanine showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and an oxygen atom. The alpha-carbon is highlighted in red.	71.1	8.2	2.35	9.87	
Valine Val V	 A structural formula of valine showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and a methylene group (CH ₂) which is further bonded to a methyl group. The alpha-carbon is highlighted in red.	99.1	6.9	2.29	9.74	
Leucine Leu L	 A structural formula of leucine showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and a methylene group (CH ₂) which is further bonded to two methyl groups. The alpha-carbon is highlighted in red.	113.2	9.7	2.33	9.74	
Isoleucine Ile I	 A structural formula of isoleucine showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and a methylene group (CH ₂) which is further bonded to a methyl group and a hydrogen atom. The alpha-carbon is highlighted in red.	113.2	6.0	2.32	9.76	
Methionine Met M	 A structural formula of methionine showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and a methylene group (CH ₂) which is further bonded to a methyl group and a sulfur atom. The sulfur atom is bonded to a methyl group (CH ₃). The alpha-carbon is highlighted in red.	131.2	2.4	2.13	9.28	
Proline Pro P	 A structural formula of proline showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and a pyrrolidine ring. The pyrrolidine ring is shown with a double bond between the alpha-carbon and the nitrogen atom, and a single bond to the beta-carbon. The beta-carbon is bonded to a hydrogen atom and a methyl group (CH ₂). The alpha-carbon is highlighted in red.	97.1	4.7	1.95	10.64	
Phenylalanine Phe F	 A structural formula of phenylalanine showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and a phenyl group (C ₆ H ₅). The alpha-carbon is highlighted in red.	147.2	3.9	2.20	9.31	
Tryptophan Trp W	 A structural formula of tryptophan showing the alpha-carbon bonded to a methyl group (NH ₃ ⁺), a hydrogen atom, a carboxylate group (COO ⁻), and a tryptamine ring. The tryptamine ring is a complex polycyclic aromatic system. The alpha-carbon is highlighted in red.	186.2	1.1	2.46	9.41	

Name, Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula ^a	Residue Mass (D) ^b	Average Occurrence in Proteins (%) ^c	pK ₁ α-COOH ^d	pK ₂ α-NH ₃ ⁺ ^d	pK _R Side Chain ^d
Amino acids with uncharged polar side chains						
Serine		87.1	6.6	2.19	9.21	
Ser S						
Threonine		101.1	5.3	2.09	9.10	
Thr T						
Asparagine ^e		114.1	4.1	2.14	8.72	
Asn N						
Glutamine ^e		128.1	3.9	2.17	9.13	
Gln Q						
Tyrosine		163.2	2.9	2.20	9.21	10.46 (phenol)
Tyr Y						
Cysteine		103.1	1.4	1.92	10.70	8.37 (sulfhydryl)
Cys C						
Amino acids with charged polar side chains						
Lysine		128.2	5.9	2.16	9.06	10.54 (ε-NH3+)
Lys K						
Arginine		156.2	5.5	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
Arg R						
Histidine ^f		137.1	2.3	1.80	9.33	6.04 (imidazole)
His H						
Aspartic acid ^f		115.1	5.4	1.99	9.90	3.90 (β-COOH)
Asp D						
Glutamic acid ^f		129.1	6.8	2.10	9.47	4.07 (γ-COOH)
Glu E						

Tableau 2. Basic set of 20 amino acids

Dr Laib

(Tymoczko et al, 2015)

Nonessential	Essential
Alanine	Histidine
Arginine	Isoleucine
Asparagine	Leucine
Aspartate	Lysine
Cysteine	Methionine
Glutamate	Phenylalanine
Glutamine	Threonine
Glycine	Tryptophan
Proline	Valine
Serine	
Tyrosine	

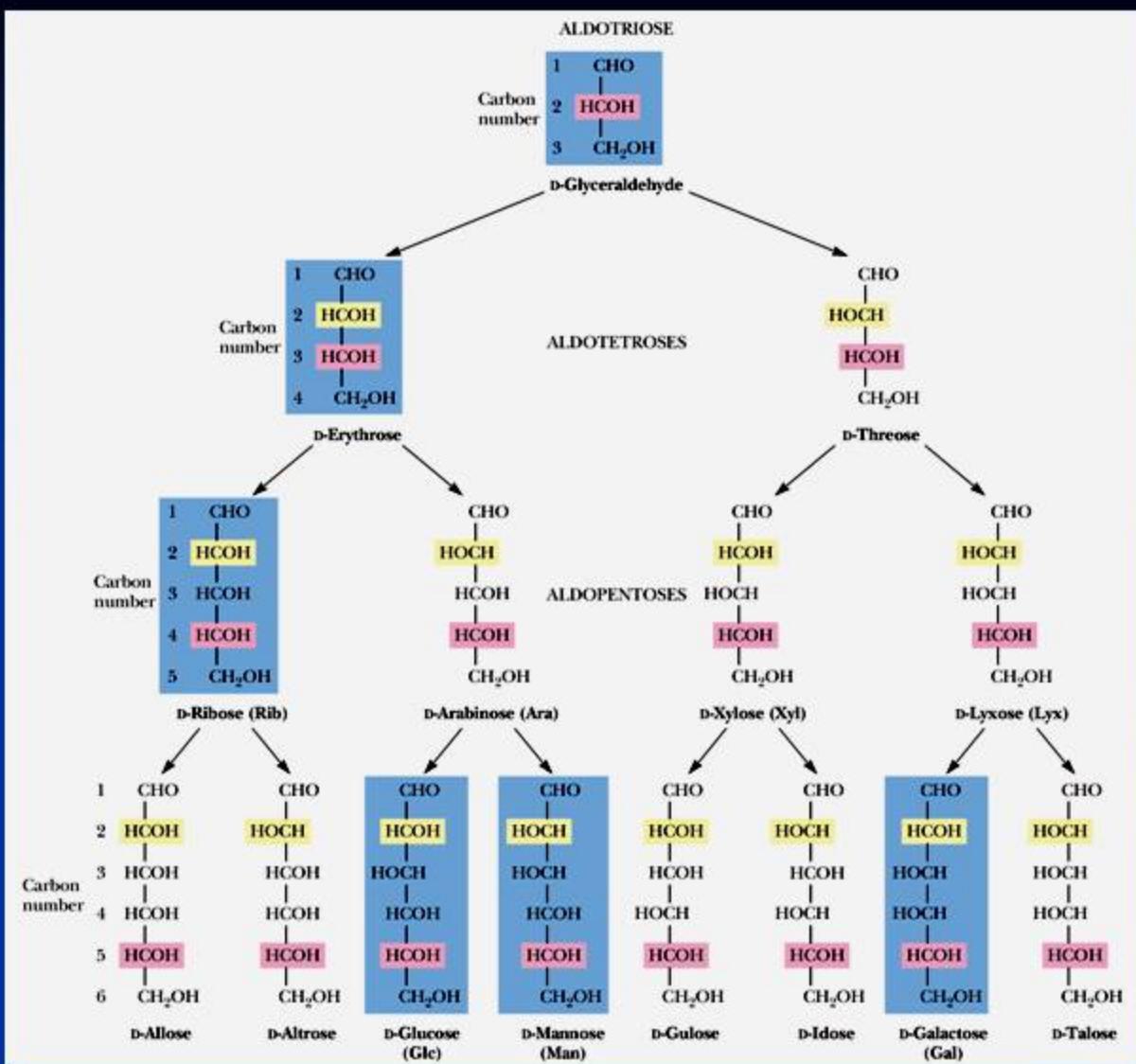


Figure 1. Héxoses

(Grisham and Garrett, 2017)

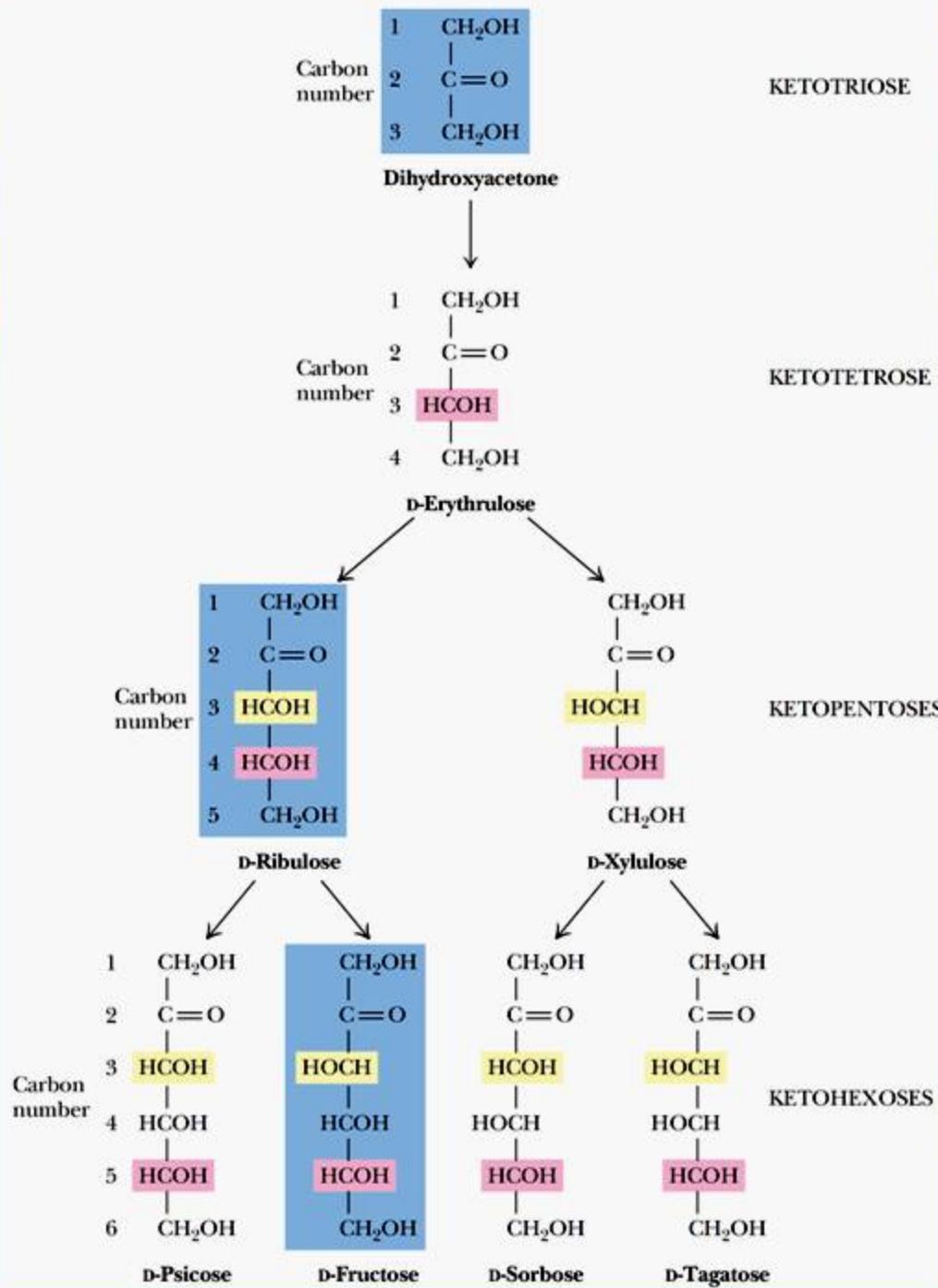


Figure 2. Cétoses.
 (Grisham and
 Garrett, 2017)

Tableau 3. The Common Biological

Dr Laib

Fatty Acids (Voet et al., 2016)

Symbol ^a	Common Name	Systematic Name	Structure	mp (°C)
Saturated fatty acids				
12:0	Lauric acid	Dodecanoic acid	<chem>CH3(CH2)10COOH</chem>	44.2
14:0	Myristic acid	Tetradecanoic acid	<chem>CH3(CH2)12COOH</chem>	53.9
16:0	Palmitic acid	Hexadecanoic acid	<chem>CH3(CH2)14COOH</chem>	63.1
18:0	Stearic acid	Octadecanoic acid	<chem>CH3(CH2)16COOH</chem>	69.6
20:0	Arachidic acid	Eicosanoic acid	<chem>CH3(CH2)18COOH</chem>	77
22:0	Behenic acid	Docosanoic acid	<chem>CH3(CH2)20COOH</chem>	81.5
24:0	Lignoceric acid	Tetracosanoic acid	<chem>CH3(CH2)22COOH</chem>	88
Unsaturated fatty acids (all double bonds are cis)				
16:1n-7	Palmitoleic acid	9-Hexadecanoic acid	<chem>CH3(CH2)5CH=CH(CH2)7COOH</chem>	-0.5
18:1n-9	Oleic acid	9-Octadecanoic acid	<chem>CH3(CH2)7CH=CH(CH2)7COOH</chem>	12
18:2n-6	Linoleic acid	9,12-Octadecadienoic acid	<chem>CH3(CH2)4(CH=CHCH2)2(CH2)6COOH</chem>	-5
18:3n-3	α-Linolenic acid	9,12,15-Octadecatrienoic acid	<chem>CH3CH2(CH=CHCH2)3(CH2)6COOH</chem>	-11
18:3n-6	γ-Linolenic acid	6,9,12-Octadecatrienoic acid	<chem>CH3(CH2)4(CH=CHCH2)3(CH2)3COOH</chem>	-11
20:4n-6	Arachidonic acid	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	<chem>CH3(CH2)4(CH=CHCH2)4(CH2)2COOH</chem>	-49.5
20:5n-3	EPA	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	<chem>CH3CH2(CH=CHCH2)5(CH2)2COOH</chem>	-54
22:6n-3	DHA	4,7,10,13,16,19-Docosohexenoic acid	<chem>CH3CH2(CH=CHCH2)6CH2COOH</chem>	-44
24:1n-9	Nervonic acid	15-Tetracosenoic acid	<chem>CH3(CH2)7CH=CH(CH2)13COOH</chem>	39