

TP 05 : Analyse d'esters méthyliques d'acides gras d'huiles comestibles par chromatographie en phase gazeuse capillaire.

Objectifs du TP

Ce TP a pour objectif d'identifier et de quantifier les acides gras présents dans des huiles végétales par CPG, puis de vérifier la conformité des résultats obtenus avec les informations fournies par les fabricants, dans le cadre d'un contrôle qualité.

II. PRINCIPE

Les acides gras présents dans les huiles ne sont pas volatils et ne peuvent pas être analysés directement en CPG. Ils doivent être transformés en **esters méthyliques d'acides gras (FAME)**, composés volatils.

Cette transformation se fait en deux étapes principales :

1. **Saponification** → libération des acides gras
2. **Estérification** → formation d'esters méthyliques

Dans ce TP, en l'absence de mélange étalon (FAME mix), **l'acide oléique est utilisé pour préparer un ester méthylique (oléate de méthyle)** servant d'étalon.

III. MODE OPÉRATOIRE

1. Préparation de l'étalon (oléate de méthyle)

Étape 1 : Estérification de l'acide oléique

L'acide oléique est transformé en oléate de méthyle (FAME) par réaction avec le méthanol (CH_3OH) en présence d'acide sulfurique (H_2SO_4) comme catalyseur, avec chauffage à $70\text{ }^\circ\text{C}$.

Étape 2 : Extraction

L'oléate de méthyle est extrait à l'aide d'éther de pétrole. Après agitation et centrifugation, deux phases sont obtenues :

- Phase organique (supérieure) : contient les esters méthyliques
- Phase aqueuse (inférieure)

1. Étape 1 : Estérification

Principe : Conversion de l'acide oléique en ester (FAME) avec du méthanol.

Conditions expérimentales :

- Réactifs :
 - Acide oléique
 - Méthanol (CH₃OH)
 - Catalyseur acide (BF₃ ou H₂SO₄)
 - Durée : 10–30 min

CH2(CH2)7CH=CH(CH2)7COOH

Méthanol → Oléate de méthyle + Eau

Température: ~ 60–70°C
Durée : 10–30 min

2. Étape 2 : Extraction de l'ester

Principe : Isoler l'oléate de méthyle dans une phase organique.

Manipulation :

1. Ajouter diéther de pétrole (ou hexane).
2. Agiter vigoureusement.
3. Ajouter de l'eau distillée.
4. Laisser refroidir.



3. Étape 3 : Séparation et préparation

Manipulation :

1. Introduire l'écstre organique.
2. Ajouter le méthanol.
3. Ajouter quelques gouttes de catalyseur acide.
4. Chauffer au bain-marie.
5. Laisser refroidir.




Na₂SO₄

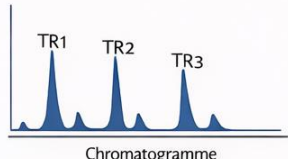
Organique Filter 's'i nécessaire.

4. Étape 4 : Analyse en CPG

Principe : Séparation des composés selon leur volatilité.

Manipulation :

1. Injecter l'échantillon dans .
2. Observer le chromatogramme.
3. Filtrer si nécessaire.



Chromatogramme

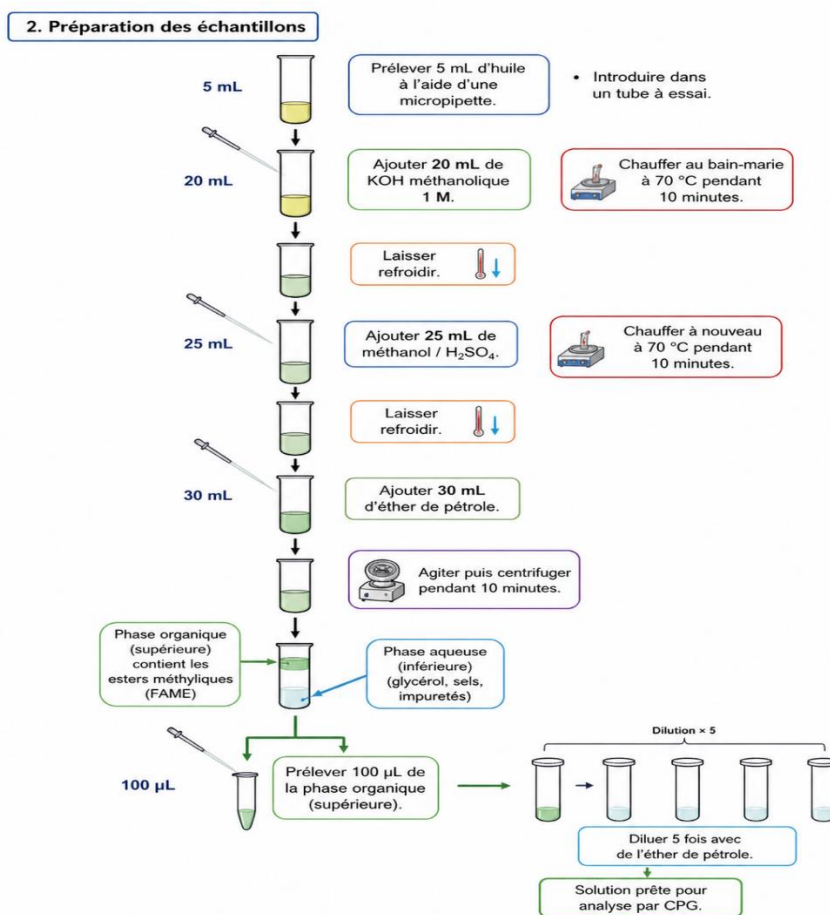
Remarque : Après l'estérification, le sulfate de sodium (Na₂SO₄) est utilisé pour éliminer les traces d'eau résiduelles dans la phase organique avant l'analyse, afin d'éviter toute interférence lors de l'injection en CPG.

Les acides gras des huiles doivent être libérés puis transformés en FAME avant analyse.

2. Préparation des échantillons

Procédure :

- ✓ Prélever 5 ml d'huile à l'aide d'une micropipette.
- ✓ Introduire dans un tube à essai.
- ✓ Ajouter 20 ml de KOH méthanolique 1 M.
- ✓ Chauffer au bain-marie à 70 °C pendant 10 minutes.
- ✓ Laisser refroidir.
- ✓ Ajouter 25ml de méthanol/H₂SO₄.
- ✓ Chauffer à nouveau à 70 °C pendant 10 minutes.
- ✓ Laisser refroidir.
- ✓ Ajouter 30 ml d'éther de pétrole.
- ✓ Agiter centrifuger pendant 10 minutes.
- ✓ Prélever 100 µL de la phase organique (supérieure).
- ✓ Diluer 5 fois avec de l'éther de pétrole.



3. Analyse des échantillons par CPG

Lors du TP, vous utiliserez **une colonne EC-WAX (Alltech®)** de 30 m de longueur, avec un diamètre interne de 0,53 mm et une épaisseur du film de phase stationnaire de 1,20 µm (cf. fiche technique en annexe).

Les paramètres d'analyses chromatographiques sont décrits ci-dessous :

- Gaz vecteur utilisé : Azote à 8 mL/min
- Injection de 1 µl d'échantillon
- Injection en split (partage du volume de l'échantillon injecté) : 1,5
- Température de l'injecteur : 250°C
- Température du détecteur (FDI): 250°C
- Température du four à optimiser pendant le TP

4. Exploitation des résultats

Afin d'identifier les esters d'acides gras obtenus, on utilisera **l'oléate de méthyle issu de l'acide oléique comme référence principale**, au lieu d'un mélange d'étalons FAME.

1. Identification des composés

L'identification des pics se fera par :

- Comparaison avec le **temps de rétention de l'oléate de méthyle (C18:1)** obtenu expérimentalement
- Analyse du profil chromatographique des échantillons

👉 Le pic correspondant à l'acide oléique est généralement :

- **Majoritaire dans certaines huiles (olive, etc.)**
- Situé à un temps de rétention caractéristique (TR oléate)

2. Lois de James et Martin

Même sans FAME mix, ces lois restent utiles :

- **1ère loi :**
Pour une série d'esters, le temps de rétention augmente avec le nombre de carbones
Ici, utilisée de manière qualitative
- **2ème loi :** À nombre de carbone égal :
- Plus il y a de doubles liaisons → plus le **temps de rétention augmente**

Application limitée car absence de gamme complète d'étalons

3. Paramètres chromatographiques : À partir du chromatogramme :

- **Temps mort (T_m) :** Temps du solvant (pic non retenu)
- **Temps de rétention (TR) :** Temps de chaque composé
- **Temps de rétention corrigé :** TR' = TR – T_m

4. Analyse quantitative

- L'aire sous chaque pic est proportionnelle à la quantité du composé
- Permet de déterminer la **composition relative (%)**

$$\text{Formule : } \% = \frac{\text{Aire du pic}}{\text{Somme des aires}} \times 100$$

5. Interprétation des chromatogrammes

- Identifier le pic de l'oléate de méthyle
- Comparer les profils entre échantillons
- Repérer :
 - composés majoritaires
 - différences entre huiles

Questions

- ✓ Pourquoi les acides gras ne peuvent-ils pas être analysés directement en CPG ?
- ✓ Quel est le rôle du KOH méthanolique dans la préparation des échantillons ?
- ✓ Pourquoi utilise-t-on l'éther de pétrole lors de l'extraction ?
- ✓ Quel est le rôle du détecteur FID en chromatographie en phase gazeuse ?
- ✓ Qu'est-ce que le temps de rétention (TR) et comment est-il utilisé pour identifier un composé ?
- ✓ Comment calculer le pourcentage d'un acide gras à partir du chromatogramme ?

III/ Annexes 1. Référence et caractéristiques des esters méthyliques d'acides gras étalons (FAME Mix)

TraceCERT[®]
Traceable Certified Reference Materials

SUPELCO[®]
Solutions within.[™]
595 North Harrison Road · Bellefonte, PA
16823-0048 USA · Phone(814)359-3441

Certificate of Analysis

Description: F.A.M.E. Mix C8-C24, 100mg, Neat

Part Number: CRM18918

Lot Number: XA24583V

Expiration Date: February 2020

Storage: Freeze

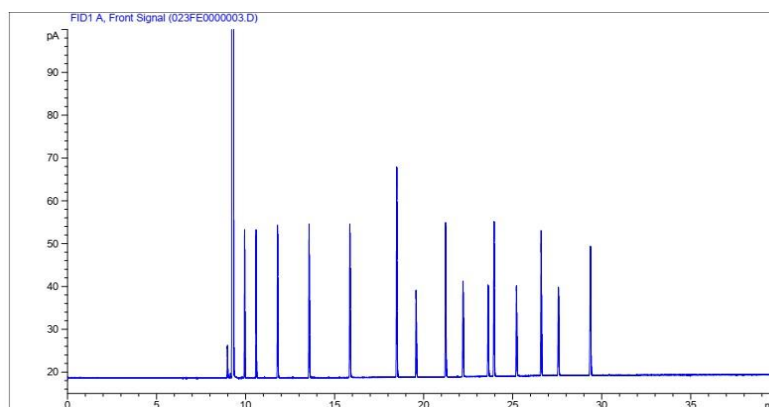
Analytical Method Parameters:

Column: SP-2560 100m x 0.25mm x 0.2µm

140°C to 240°C at 4°C/min, 15 min hold

Detector: 260 °C; 10mg/mL solution

Injection Volume: 1µL



Elution	Analyte	Lot Number	CAS Number	Chromatographic Purity %	Certified Weight %	Ucrm %	Analytical Weight %
	Internal Standard	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2.	Methyl octanoate	LC13561	111-11-5	99.9	8.0	±0.61	8.2
3.	Methyl decanoate	LC04160	110-42-9	99.9	8.0	±0.48	8.2
4.	Methyl laurate	LB97659	111-82-0	99.9	8.0	±0.46	8.2
5.	Methyl tetradecanoate	LC17239	124-10-7	99.9	8.0	±0.44	8.2
6.	Methyl palmitate	LC17089	112-39-0	99.9	11.0	±0.60	11.3
7.	Methyl Palmitoleate	LC20929	1120-25-8	99.9	5.0	±0.26	5.1
8.	Methyl octadecanoate	LC13654	112-61-8	99.9	8.0	±0.47	8.3
9.	cis-9-Oleic acid methyl ester	LC22386	112-62-9	99.9	5.0	±0.29	5.2
10.	Methyl Linoleate	LC06225	112-63-0	98.9	5.0	±0.29	5.2
11.	Methyl Arachidate	LC24951	1120-28-1	99.9	8.0	±0.51	8.3
12.	Methyl Linolenate	LC22644	301-00-8	99.0	5.0	±0.31	5.2
13.	Methyl docosanoate	LC20287	929-77-1	99.9	8.0	±0.56	8.3
14.	Methyl Erucate	LC24141V	1120-34-9	99.5	5.0	±0.35	5.2
15.	Methyl lignocerate	LC10925	2442-49-1	99.9	8.0	±0.62	8.3

ANAB
ACCREDITED
TESTING LABORATORY
Cert# AT-1607

ANAB
ACCREDITED
REFERENCE MATERIAL
PRODUCER
Cert# AR-1606

Produced in double accredited laboratory fulfilling
ISO/IEC 17025 and
ISO Guide 34

Page 1 of 2

SIGMA-ALDRICH[®]

1. Référence et caractéristiques de la colonne EC-WAX

Alltech EC™ -WAX, AT™ -WAX, MC™ -WAX Capillary Columns

capillary gc

Alltech EC™ -WAX, AT™ -WAX, MC™ -WAX

- 100% Polyethylene Glycol
- Polar
- Similar to DB™-WAX, DB™-WAXetr, Rtx™-WAX, Stabilwax®, Carbowax® 20M, SUPELCOWAX™-10, Innowax™, HP™-20M, HP™-Wax, BP™-20, CP-Wax-52-CB, 007™-CW, SUPEROX™ II, Omegawax, ZB-WAX
- USP G14, G15, G16, G20, G39

Econo-Cap™ EC™ -WAX Capillary Columns

- Batch Tested to Dramatically Reduce Price
- Ideal for Aggressive Applications

EC™ -WAX Capillary Columns

LENGTH	ID	FILM	TEMP. LIMITS	PART No.	PRICE
15m	0.45mm	1.00µm	40/260°C	19667	
	0.53mm	1.00µm	40/260°C	19674	
	0.53mm	1.20µm	40/260°C	19653	
30m	0.25mm	0.25µm	40/280°C	19655	
	0.32mm	0.25µm	40/280°C	19654	
	0.45mm	1.00µm	40/260°C	19663	
	0.53mm	1.00µm	40/260°C	19676	
	0.53mm	1.20µm	40/260°C	19659	



For more information on the Econo-Cap™ Capillary Line, refer to page 44.

AT™ -WAX Capillary Columns

LENGTH	ID	FILM	TEMP. LIMITS	PART No.
30m	0.25mm	0.15µm	40/280°C	13418
	0.25mm	0.20µm	40/280°C	9925302
	0.25mm	0.25µm	40/280°C	136462
	0.25mm	0.50µm	40/260°C	136472
	0.25mm	1.00µm	40/260°C	137322
	0.32mm	0.25µm	40/280°C	136482
	0.32mm	0.30µm	40/280°C	9932302
	0.32mm	0.50µm	40/260°C	136522
	0.32mm	1.00µm	40/260°C	137382
	0.53mm	0.50µm	40/260°C	14111
	0.53mm	1.00µm	40/260°C	13907
	0.53mm	1.20µm	40/260°C	9951302
	0.53mm	2.00µm	40/250°C	16162
	0.53mm	2.50µm	40/250°C	16885
0.53mm	5.00µm	40/250°C	16887	
50m	0.25mm	0.20µm	40/280°C	9925502
	0.32mm	0.30µm	40/280°C	9932502
	0.53mm	1.20µm	40/260°C	13946
60m	0.25mm	0.25µm	40/280°C	136942
	0.25mm	0.50µm	40/260°C	13916
	0.32mm	0.25µm	40/280°C	136962
	0.32mm	0.30µm	40/280°C	9932602
	0.32mm	0.50µm	40/260°C	136972
	0.53mm	0.50µm	40/260°C	13901
	0.53mm	1.00µm	40/260°C	13929
	0.53mm	1.20µm	40/260°C	13850