

MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE POUR LE DOSAGE DES COMPOSÉS O-DIPHÉNOLIQUES DANS LES HUILES D'OLIVE

MÉTHODE RÉVISÉE : Décembre 2007

Par Arturo Cert, Ana Romero et R. Cert
Instituto de la Grasa (CSIC), Séville, Espagne

1.- Matériel

- 1.1. Équipement pour extraction sur phase solide (SPE)
- 1.2. Cartouches de diol de 6 ml (0,5 g) (eau ou similaire)
- 1.3. Seringue à membrane filtrante en acétate de cellulose (diamètre pore 0,45 μm , (Alltech, Scharlab ou similaire)
- 1.4. Évaporateur rotatif sous vide
- 1.5. Spectrophotomètre UV visible à $\lambda=370$ nm, avec cuves de quartz de parcours optique de 10,0 mm

2.- Solvants et réactifs

- 2.1. N-hexane AR
- 2.2. Mélange n-hexane/acétate d'éthyle
- 2.3. Méthanol pour spectrométrie UV
- 2.4. Eau distillée ou déminéralisée
- 2.5. Molybdate de sodium dihydraté, AR (Merck ou équivalent)
- 2.6. Catéchol (pyrocatechol) (≥ 99 %) (Aldrich ou équivalent)
- 2.7. Solution méthanol/eau 1:1 (v/v)
- 2.8. Solution A. Méthanol/eau 1:1 acidifiée avec de l'acide hydrochlorique préparé en ajoutant 0,5 ml de 6N HCl à 100 ml de la solution méthanol/eau 1:1 (2.7)
- 2.9. Solution de 5 % de molybdate de sodium dihydraté dans la solution méthanol/eau 1:1 (2.7)

3.- Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage (concentration, exprimée en millimol/ml, vs absorbance) est obtenue en mesurant les solutions de pyrocatechol dans la solution A (2.8). Des solutions de pyrocatechol sont préparées dans une gamme de 0,02 – 0,07 mg/ml. Ces solutions doivent être fraîchement préparées et protégées de l'exposition à la lumière. À l'aide d'une pipette munie d'une seringue filtrante en acétate de cellulose, prélever 2 ml de solution phénolique et verser dans un tube en verre. Puis ajouter 0,5 ml d'une solution de molybdate de sodium (2.9) et agiter le mélange. Mesurer l'absorbance à $\lambda=370$ nm. L'absorbance de la solution phénolique est comparée à l'absorbance d'une solution étalon obtenue en mélangeant 2 ml de solution phénolique avec 0,5 ml d'éthanol/eau (1:1) (2.7).

Des solutions de catéchol, hydroxytyrosol et acétate d'hydroxytyrosyl ont donné l'équation suivante pour une gamme d'absorbance de 0,2 – 0,8 :

$$\text{Concentration des } o\text{-diphénols (mmol/ml)} = (-0,170 + 8,236 * \text{ABS}) * 10^{-4}$$

où ABS = absorbance solution phénolique – absorbance solution étalon

4.- Isolement de l'extrait phénolique

Dissoudre un échantillon d'huile d'olive ($6 \pm 0,001$ g) dans 6 ml d'hexane (2.1.).

Placer une cartouche de diol de 6 ml (1.2) dans un dispositif d'élution sous vide. Conditionner la cartouche en faisant passer 9 ml de méthanol (2.3) et 9 ml d'hexane (2.1), puis utiliser le vide pour éviter le séchage de la colonne.

Appliquer la solution d'huile à la colonne et la faire passer dans la cartouche. Laver le récipient contenant l'échantillon avec deux doses de 4 ml d'hexane extraites de la cartouche. Laver de nouveau le récipient avec 3 ml du mélange hexane/acétate d'éthyle (90:10, v/v) (2.2) vidé de la cartouche et éliminé. Puis placer une fiole conique de 25 ml et éluer la colonne avec 15 ml de méthanol (2.3). Faire évaporer le solvant dans un évaporateur rotatif à température ambiante sous vide jusqu'à son séchage. Dissoudre le résidu dans 5 ml de la solution A acidifiée (2.8).

5.- Détermination spectrophotométrique

À l'aide d'une pipette munie d'une seringue filtrante en acétate de cellulose, prélever 2 ml de solution phénolique et verser dans un tube en verre. Puis ajouter 0,5 ml d'une solution de molybdate de sodium (2.9) et agiter le mélange. Mesurer l'absorbance à $\lambda=370$ nm. L'absorbance de la solution phénolique est comparée à l'absorbance d'une solution étalon obtenue en mélangeant 2 ml de solution phénolique avec 0,5 ml d'éthanol/eau (1:1) (2.7).

Si l'absorbance de la solution phénolique est supérieure à 0,8, un nouvel extrait phénolique doit être prélevé et dissous dans 10 ml de solution A (2.8) au lieu de 5 ml. Une extraction à partir de 3 g d'huile constitue une alternative.

Si l'absorbance de la solution phénolique est inférieure à 0,2, les extraits phénoliques d'au moins deux cartouches doivent être mélangés et dissous dans 5 ml de solution A (2.8).

Avec une seule cartouche, la concentration minimum déterminée est de 0,15 mmol/kg d'huile.

5.- Calculs

La concentration de *o*-diphénols dans les huiles, exprimée en millimol/kg, est calculée comme suit:

$$[C] \text{ dans l'huile (mmol/kg)} = (C_{\text{extr}} * 2,5 * V_{\text{extr}} * 1000) / 2 * W_{\text{huile}}$$

où:

C_{extr} (mmol/ml) = concentration dans l'extrait calculée en appliquant l'absorbance à la courbe d'étalonnage

2,5 = volume (ml) du mélange de réaction

V_{extr} = volume total (ml) de la solution d'extraction

2 = Volume (ml) de la solution d'extraction issue de la réaction

W_{huile} = poids (g) de l'échantillon d'huile.

Les résultats doivent être exprimés en millimol de *o*-diphénols / kg d'huile.