



MÉTHODE D'ANALYSE

DETERMINATION DES ACIDES GRAS ISOMERES TRANS MOYENNANT ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

1. Objet et champ d'application

La présente norme décrit un procédé de détermination de la teneur en acides gras trans dans les matières grasses végétales moyennant chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. La méthode est applicable aux matières grasses dont les acides gras ont un nombre d'atomes de carbone compris entre 10 et 24; elle n'est pas applicable aux matières grasses végétales ayant subi un processus quelconque d'hydrogénation.

AVERTISSEMENT: La présente norme peut requérir l'emploi d'appareillages et de substances dangereuses ou l'exécution d'opérations comportant un certain risque. La méthode ne prévoit pas tous les problèmes de sécurité que son emploi peut poser; dès lors, il appartiendra à quiconque l'utilise de rechercher et d'établir préalablement les mesures de sécurité appropriées et les mesures législatives éventuelles à appliquer.

2. Principe

Les esters méthyliques d'acides gras sont préparés à partir de la matière grasse, puis analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Les acides gras sont identifiés en fonction de leurs temps de rétention. Leur taux est déterminé par le rapport entre l'aire des pics correspondants et la sommation des aires des pics de tous les acides gras.

3. Signification de l'essai

Déterminer les isomères trans des acides gras insaturés à 18 atomes de carbone susceptibles d'être présents à des concentrations définies dans les matières grasses végétales naturelles et dans celles soumises à un processus de raffinage.

4. Définitions

D'après cette méthode, le taux d'acides gras trans d'une matière grasse végétale est donné par la somme des taux des acides:

- trans-octadécénoïques (T 18:1)
- trans, trans-octadécadiénoïques (TT 18:2)
- cis-trans et trans-cis octadécadiénoïques [(CT + TC) 18:2]
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis et trans-cis-cis octadécatriénoïques [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], par rapport aux acides gras totaux.

5. Appareillage

- 5.1.** Chromatographe en phase gazeuse approprié au fonctionnement sur colonne capillaire, équipé d'un système de fractionnement, constitué de:
 - 5.1.1.** Enceinte thermostatique pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision d'environ 0,1 °C.
 - 5.1.2.** Ensemble d' injection thermoréglable.
 - 5.1.3.** Détecteur a ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.
 - 5.1.4.** Régulateurs de débit pour le gaz vecteur et les gaz auxiliaires.
- 5.2.** Colonne capillaire en verre ou silice fondue, au diamètre intérieur de 0,25 à 0,32 mm, de 50 m de long, recouverte de cyanopropylsilicone (1) avec une épaisseur comprise entre 0,1 et 0,3 μm .
- 5.3.** Enregistreur-Intégrateur approprié au fonctionnement avec le convertisseur-amplificateur, avec un temps de réponse non supérieur à 1 seconde et une vitesse de déroulement du papier variable.
- 5.4.** Microseringue pour chromatographie en phase gazeuse de 10 μl avec aiguille cémentée.
- 5.5.** Evaporateur rotatif.
- 5.6.** L'équipement nécessaire pour la préparation des esters méthyliques.

(1) Des colonnes chromatographiques toutes prêtes sont disponibles dans le commerce (ex.: SP 2340, CP Sil 88, Silar 10, etc.)

6. Réactifs et matériel

- 6.1. Gaz vecteur: hélium et hydrogène purs pour chromatographie (Important: cf. notes en appendice).
- 6.2. Gaz auxiliaire: air et hydrogène pour chromatographie (Important: cf. notes en appendice).
- 6.3. Echantillons de référence: esters méthyliques d'acides gras purs, en particulier des isomères cis et trans des acides octadécénoïques (1), octadécadiénoïques (2) et octadécatriénoïques (1).
- 6.4. n-Hexane (Important: cf. notes en appendice).

7. Mode opératoire (Procédé)

- 7.1. Préparation des esters méthyliques. Utiliser un procédé prévoyant la catalyse basique.

Les matières grasses dont l'acidité libre est supérieure à 3% doivent être préalablement neutralisées.

- 7.2. Contrôle du chromatographe et conditionnement de la colonne

Après exécution des contrôles préliminaires de l'ensemble d'injection et de l'enregistreur, procéder au montage de la colonne sur le chromatographe en phase gazeuse, sans toutefois relier l'extrémité de sortie au détecteur. Faire passer un léger courant de gaz vecteur (1-2 ml/min.) à travers la colonne et commencer un chauffage graduel jusqu'à atteindre, au bout de 4 heures au minimum, la température de 210°C. Maintenir la colonne à cette température à tout le moins pendant une nuit, puis laisser refroidir; relier par la suite l'extrémité de sortie au détecteur et, après avoir contrôlé la stabilité de la connection, reporter l'ensemble d'injection à la température de conditionnement. Insérer le détecteur et l'enregistreur et, au bout de 3-4 heures, contrôler si la linéarité et la déviation du tracé de la ligne de base, opérant à une sensibilité au moins quatre fois supérieure à celle prévue pour l'exécution de l'analyse, sont satisfaisantes (une déviation positive supérieure à 5% du fond de l'échelle/heure indique un conditionnement insuffisant de la colonne).

-
- (1) Les esters méthyliques des acides octadécénoïques et octadécatriénoïques sont disponibles dans le commerce (par ex. auprès des firmes Alltech, Supelco, etc.)
 - (2) Les isomères de l'acide octadécadiénoïque peuvent être préparés au laboratoire par isomérisation d'acide linoléique pur à l'aide de sélénium (cf. Strocchi A. et al., Rivista Italiana delle Sostanze Grasse n ° 45 (8) 607 (1968); Schonfield et al., Journal of American Oil Chemists Society 38, 208 (1961).

7.3. Choix des conditions opératoires et contrôle de l'efficacité de la colonne

7.3.1. Conditions opératoires

Les conditions opératoires générales sont les suivantes:

- température de la colonne de 150 à 200°C, éventuellement température programmée (par ex. 165°C pendant 15 minutes, puis augmentation de 5°C/min. jusqu'à la température de 200°C;
- température de l'injecteur: 250°C;
- température du détecteur: de 260 à 280°C;
- volume de gaz vecteur (hélium ou hydrogène): 1,2 ml/min.;
- quantité du substance injectée: 1 μ l de solution à 2 p. cent dans l'hexane.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et des conditions de réalisation de la chromatographie en phase gazeuse de façon à obtenir un profil chromatographique en phase gazeuse similaire à celui faisant l'objet de la Figure 1. Contrôler que le pic de l'acide linoléique (C 18:3) est complètement résolu immédiatement avant l'apparition du pic de l'acide eicosénoïque (C 20:1); s'il ne devait pas en être ainsi, il faut modifier la température du four et/ou utiliser une colonne à polarité différente.

7.3.2. Efficacité de la colonne

7.3.2.1. L'efficacité d'une colonne est déterminée par son pouvoir de séparation et de résolution. Dès lors, aux fins de l'exécution correcte des analyses, elle doit fournir des chromatogrammes répondant aux conditions suivantes:

- pouvoir de séparation: il doit y avoir séparation nette des pics des esters méthyliques de tous les acides gras présents;
- pouvoir de résolution: il est nécessaire que les pics soient aussi complètement résolus, ce qui veut dire que le tracé du pic doit avoir rejoint la ligne de base avant la sortie du pic suivant. Pour certains couples typiques, comme par exemple les acides trans C18:1 /cis 18:1, une résolution incomplète est toutefois tolérée. Dans de tels cas, l'efficacité de la colonne est considérée comme satisfaisante lorsque l'indice de résolution est supérieur à 2. L'indice de résolution entre deux pics est défini par le rapport:

$$\frac{a}{b}$$

où:

a = distance de la ligne de base au sommet du pic le plus petit;

b = distance de la ligne de base au point le plus bas du tracé de la courbe entre les deux pics.

7.3.2.2. Pour la vérification des conditions précitées, injecter plusieurs fois des masses égales de la prise d'essai du mélange d'esters méthyliques et modifier opportunément la température et le débit du gaz vecteur jusqu'à obtenir la meilleure séparation. En outre, vérifier le pouvoir de résolution en diminuant éventuellement la prise d'essai et en augmentant la sensibilité jusqu'à obtenir la meilleure résolution des pics.

Si l'on obtient la séparation de tous les acides gras présents et un indice de résolution supérieur à 2, considérer la colonne comme appropriée et maintenir les conditions opératoires choisies pour la réalisation de toutes les déterminations suivantes. Dans le cas contraire, la colonne n'est pas à considérer comme efficace.

7.4. Exécution de l'analyse. A l'aide de la microsiringue de 10 μ l, prélever 1 μ l d'hexane, aspirer 0,5 μ l d'air et, par la suite, 0,5 + 1 μ l de la solution de l'échantillon; tirer encore le piston de la siringue de façon à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille à travers la membrane de l'ensemble d'injection et, après 1-2 secondes, injecter rapidement, puis extraire lentement l'aiguille au bout de S secondes. Procéder à l'enregistrement jusqu'à élution complète des esters méthyliques présents. Le tracé de la ligne de base doit toujours répondre aux conditions requises sous 7.3.2.1.

7.5. Identification des pics. Les esters méthyliques des acides gras apparaissent sur le chromatogramme selon une progression qui est fonction directe de leur nombre d'atomes de carbone. Les esters insaturés sont élués après les esters saturés correspondants et leur élution est fonction directe du nombre de doubles liaisons. Les esters des acides gras trans sont élués avant les isomères cis correspondants.

L'identification des esters méthyliques individuels est effectuée ensuite à travers la mesure des temps de rétention qui sont comparés aux temps de rétention de mélanges de référence. Un exemple de chromatogramme est donné dans la fig. 1.

7.6. Evaluation quantitative

7.6.1. Procéder au calcul des aires de chacun des pics à l'aide de l'intégrateur électronique. Pour obtenir une sensibilité analytique appropriée, la hauteur du pic correspondant à l'ester méthylique de l'acide arachidique ne doit pas être inférieure à 20% du fond de l'échelle. Pour l'huile d'arachide, cette hauteur ne doit pas être inférieure à 50%.

7.6.2. Le pourcentage de chaque acide gras est calculé à partir du rapport entre l'aire du pic correspondant et la sommation des aires de tous les pics présents selon la formule:

$$100 \frac{A_x}{\Sigma A}$$

où:

A_x = aire du pic de l'acide gras x;

ΣA = sommation des aires de tous les pics.

8. Expression des résultats

8.1. Rapporter comme "acides gras trans totaux, %" la somme des pourcentages des acides:

- trans-octadécénoïques;
- trans-trans octadécadiénoïques;
- cis-trans et trans-cis octadécadiénoïques;
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis et trans-cis-cis octadécatriénoïques.
- Exprimer le résultat avec deux décimales.

Note

Pour assurer l'évaluation analytique correcte des résultats, certaines précautions sont à observer. En effet, de petites quantités d'acide oléique trans peuvent se former pendant la phase d'introduction de l'échantillon dans l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse. Pour éviter ce phénomène, il importe de vérifier la procédure de la manière suivante:

Un échantillon d'esters méthyliques d'huile d'olive vierge extra d'origine certaine (ou un étalon d'oléate de méthyle, ou un mélange avec des esters méthyliques d'acides gras ayant une teneur minimale en acide oléique de 60%, certifiés exempts d'acides gras trans) préparé comme décrit sous 7.1, est analysé dans les conditions prévues par la méthode; mesurer le pourcentage d'acides gras trans octadécénoïques; normalement, il n'y a pas présence d'acides gras trans; une présence d'acides gras trans octadécénoïques égale à 0,01 % est néanmoins tolérée.

Dans l'hypothèse où seraient mesurées des valeurs supérieures, l'insert de l'injecteur doit être remplacé par un insert parfaitement propre et désactivé et il faut répéter l'analyse.

Une précaution ultérieure est à observer en ce qui concerne les inserts d'injection remplis avec des matériaux divers (laine de verre, terre de diatomées, etc.), la présence de ces matériaux étant susceptible de catalyser la formation d'acides gras trans.

Dans ce cas aussi, quelques précautions sont à observer.

Analyser un échantillon d'huile d'olive vierge extra d'origine certaine, comme dans le cas précité; mesurer le pourcentage d'acides gras trans octadécénoïques. Si les valeurs obtenues dépassent le taux de 0,01 %, procéder comme suit:

- 1) remplacer l'insert de l'injecteur par un insert propre et désactivé;
- 2) réduire la température de l'injecteur de 30 - 50°C et répéter l'essai jusqu'à obtenir des valeurs d'acides gras trans octadécénoïques égales ou inférieures à la limite susmentionnée;
- 3) Enlever le matériau de remplissage éventuel de l'injecteur*.

Pour l'analyse des huiles d'olive vierges extra il convient en outre d'observer une précaution additionnelle. En effet, lors de l'analyse d'huiles authentiques, il y a d'habitude la formation d'un pic dont le temps de rétention est pratiquement identique à celui du cis-trans linoléique; ce pic, dont la valeur varie aux alentours de 0,01 %, ne doit pas être pris en considération dans le calcul au cas où il apparaîtrait de façon isolée sur le chromatogramme; par contre, il doit en être tenu compte s'il apparaît sur le chromatogramme conjointement avec le trans-cis linoléique.

* Le matériau de remplissage (laine de verre, terre de diatomées, etc.) est nécessaire dans l'hypothèse de l'emploi d'échantillonneurs automatiques; par contre, Si l'injection est effectuée manuellement, le matériau de remplissage peut être enlevé.

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

1. Analyse des résultats de l'essai collaboratif

Les marges de précision de la méthode figurent dans le tableau ci-après.

L'essai collaboratif proposé par le Secrétariat exécutif en 1999 aux laboratoires agréés par le Conseil Oléicole International à cette date, a été réalisé par 19 laboratoires de 8 pays.

L'essai a porté sur cinq échantillons:

- A: huile d'olive vierge extra
- B: huile d'olive vierge + huile de tournesol raffinée
- C: huile d'olive vierge + huile de grignons d'olive raffinée
- D: huile d'olive vierge + huile de soja raffinée + huile de tournesol raffinée
- E: huile d'olive raffinée + huile de grignons d'olive raffinée + huile de soja raffinée + huile d'olive vierge lampante.

L'analyse statistique des résultats de l'essai collaboratif réalisée par le Secrétariat exécutif du Conseil Oléicole International a suivi les règles établies dans les normes ISO 5725 **Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure**; l'examen des valeurs aberrantes a été réalisé par l'application du test de Cochran et du test de Grubbs sur les résultats des laboratoires pour chaque détermination (réplicats a et b) et chaque échantillon.

Le tableau fait état des informations suivantes :

n	Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
outliers	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
mean	Moyenne des résultats acceptés
r	Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 % , la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire avec le même opérateur utilisant le même appareillage et pendant un court intervalle de temps
S_r	Écart-type de répétabilité
RSD_r (%)	Coefficient de variation de répétabilité (S _r x 100 / mean)

R Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents, avec des opérateurs différents utilisant un appareillage différent

S_R Écart-type de reproductibilité

RSD_R (%) Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Composition en acides gras trans (%): C18:1T

	A	B	C	D	E
n	17	17	17	17	17
outliers	5	2	4	0	0
mean	0,012	0,020	0,020	0,021	0,051
r	0,007	0,009	0,010	0,010	0,020
S_r	0,003	0,003	0,004	0,004	0,007
RSD_r (%)	22,610	20,160	32,110	22,001	14,080
R	0,010	0,021	0,021	0,023	0,031
S_R	0,004	0,008	0,008	0,008	0,011
RSD_R (%)	30,960	46,580	32,110	50,003	21,741

Composition en acides gras trans (%): C18:2T+ C18:3T

	A	B	C	D	E
n	16	17	16	17	17
outliers	5	2	2	4	0
mean	0,014	0,032	0,011	0,044	0,303
r	0,011	0,010	0,007	0,010	0,043
S_r	0,004	0,004	0,003	0,004	0,015
RSD_r(%)	34,920	13,361	18,983	9,852	5,061
R	0,016	0,020	0,017	0,023	0,131
S_R	0,006	0,007	0,006	0,008	0,047
RSD_R (%)	47,702	25,643	42,801	22,413	15,392

2. Bibliographie

ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 1: Principes généraux et définitions

ISO 5725-2: 1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-5: 1998 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 5: Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-6:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6: Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude

Fig. 1. Chromatogramme-type relatif à la détermination des acides gras trans, effectuée sur colonne capillaire.

