



MÉTHODE D'ANALYSE

DETERMINATION DU CONTENU EN ALCOOLS ALIPHATIQUES ET TRITERPÉNIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET

La méthode décrit un procédé de détermination du contenu en alcools aliphatiques et triterpéniques des matières grasses.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La matière grasse, additionnée de 1-éicosanol comme standard interne, est saponifiée avec de l'hydroxyde de potassium en solution dans l'éthanol, puis l'insaponifiable est extrait avec de l'éther éthylique. La fraction des alcools est séparée de l'extrait insaponifiable par chromatographie sur plaque de gel de silice basique; les alcools récupérés dans le gel de silice sont transformés en triméthylsilyléthers et analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. APPAREILLAGE

- 3.1. Ballon de 250 millilitres muni d'un réfrigérant à reflux avec embouts rodés.
- 3.2. Ampoule à décanter de 500 millilitres.
- 3.3. Ballons de 250 millilitres.
- 3.4. Équipement complet pour chromatographie sur couche mince, avec plaques de verre de 20 x 20 centimètres.
- 3.5. Lampe à lumière ultraviolette, de longueur d'onde de 366 ou 254 nm.
- 3.6. Microseringues de 100 et 500 microlitres.
- 3.7. Ampoule cylindrique filtrante à filtre poreux G3 (porosité 15 à 40 micromètres) de 2 centimètres de diamètre environ et de 5 centimètres de hauteur, avec embout approprié pour filtration sous vide et embout rodé mâle 12/21.

- 3.8. Fiole à vide de 50 millilitres avec embout rodé femelle 12/21 adaptable à l'ampoule filtrante (3.7).
- 3.9. Tube à fond conique, de 10 millilitres, avec bouchon hermétique.
- 3.10. Chromatographe en phase gazeuse approprié au fonctionnement sur colonnes capillaires, équipé de:
 - 3.10.1. Enceinte thermostatée pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision d'environ 1° C.
 - 3.10.2. Injecteur thermoréglable de type diviseur de flux ("split") avec élément vaporisateur en verre persilanisé ou du type "on column".
 - 3.10.3. Détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.
 - 3.10.4. Enregistreur-intégrateur approprié au fonctionnement avec un convertisseur-amplificateur avec un temps de réponse non supérieur à 1 seconde et avec une vitesse de papier variable.
- 3.11. Colonne capillaire en verre ou en silice fondue, de 20 à 30 mètres de long, de 0,25 à 0,32 millimètre de diamètre intérieur, recouverte intérieurement de liquide SE-52 ou SE-54 ou équivalent, avec une épaisseur comprise entre 0,10 et 0,30 micromètre.
- 3.12. Microseringue pour chromatographie en phase gazeuse de 10 microlitres avec aiguille cémentée.
- 3.13. Balance de précision ayant une sensibilité de 1 mg (avec affichage 0.1mg).

4. RÉACTIFS

- 4.1. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique à environ 2N: dissoudre, tout en refroidissant, 130 grammes d'hydroxyde de potassium (titre minimum 85%) dans 200 millilitres d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol. La solution se conserve dans des bouteilles de verre opaque bien bouchées.
- 4.2. Éther éthylique, pour analyses.
- 4.3. Sulfate de sodium anhydre pur, pour analyses.
- 4.4. Plaques de verre recouvertes de gel de silice sans indicateur de fluorescence, de 0,25 millimètre d'épaisseur (elles sont disponibles dans le commerce déjà prêtes à l'emploi).
- 4.5. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique à 0,2 N: dissoudre 13 grammes d'hydroxyde de potassium dans 20 millilitres d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol.
- 4.6. Benzène, pour chromatographie (5.2.2).

- 4.7. Acétone, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.8. Hexane pour chromatographie (5.2.2).
- 4.9. Éther éthylique, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.10. Chloroforme pur, pour analyse.
- 4.11. Solution de référence pour la chromatographie sur couche mince: 0,5% d'alcools C20-C28 dans du chloroforme ou fraction d'alcools obtenue comme indiqué au point 5.2. à partir de l'insaponifiable d'une huile de grignons d'olive.
- 4.12. Dichloro-2',7' fluorescéine, solution éthanolique à 0,2 %. Elle est rendue légèrement basique par addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique 2N d'hydroxyde de potassium.
- 4.13. Pyridine anhydre, pour chromatographie.
- 4.14. Hexaméthylsilazane.
- 4.15. Triméthylchlorosilane.
- 4.16. Solution étalon de triméthylsilyléthers des alcools aliphatiques de C₂₀ à C₂₈. À préparer au moment de l'emploi à partir de mélanges d'alcools purs.
- 4.17. 1-icosanol, solution à 0,1% (m/V) dans le chloroforme (standard interne).
- 4.18. Gaz vecteur: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.19. Gaz auxiliaire: azote pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

5. PROCÉDÉ

5.1. Préparation de l'insaponifiable

- 5.1.1. Introduire dans le ballon de 250 millilitres, au moyen de la microseringue de 500 microlitres, un volume de solution d'1-icosanol à 0,1 % dans le chloroforme (4.17) qui contient une quantité d'1-icosanol qui correspond à environ 10 % du contenu en alcools aliphatiques dans l'aliquote de l'échantillon à prélever pour la détermination. Par exemple, pour 5 grammes d'échantillon, il faut ajouter 250 microlitres de la solution d'1-icosanol à 0,1 % s'il s'agit d'un échantillon d'huile d'olive et 1 500 microlitres s'il s'agit d'huile de grignons d'olive.

Evaporer dans un courant d'azote jusqu'à dessiccation, puis peser exactement 5 grammes d'échantillon sec et filtré dans le même ballon.

- 5.1.2. Ajouter 50 millilitres de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 2 N, mettre en marche le réfrigérant à reflux, chauffer au bain-marie jusqu'à légère ébullition tout en maintenant une agitation énergique jusqu'à ce que la saponification se soit produite (la solution devient limpide). Continuer à réchauffer pendant 20 minutes, puis ajouter 50 millilitres d'eau distillée que l'on fait descendre du haut du réfrigérant, débrancher le réfrigérant et refroidir le ballon à environ 30° C.

- 5.1.3. Transvaser le contenu du ballon, de façon quantitative, dans une ampoule à décanter de 500 millilitres, en s'aidant d'eau distillée à plusieurs reprises, en utilisant au total environ 50 millilitres. Ajouter environ 80 millilitres d'éther éthylique, agiter énergiquement durant environ 30 secondes et laisser la séparation se faire (note 1).

Séparer la phase aqueuse inférieure en la recueillant dans une autre ampoule à décanter. Faire encore deux extractions sur la phase aqueuse, selon les mêmes modalités, en utilisant à chaque fois 60 à 70 millilitres d'éther éthylique.

Note 1: Des éventuelles émulsions peuvent être éliminées en ajoutant, avec une pissette, une petite quantité d'alcool éthylique ou méthylique.

- 5.1.4. Réunir les extraits étherés dans une seule ampoule à décanter et laver à l'eau distillée (50 millilitres à chaque fois) jusqu'à réaction neutre de l'eau de lavage.

Éliminer l'eau de lavage, dessécher au sulfate de sodium anhydre et filtrer, sur sulfate de sodium anhydre, dans un ballon de 250 millilitres pesé au préalable, en lavant ampoule et filtre avec de petites quantités d'éther éthylique.

- 5.1.5. Distiller l'éther jusqu'à ce qu'il n'en reste qu'une petite quantité, puis porter à sec sous un léger vide ou dans un courant d'azote, parfaire le séchage à l'étuve à 100° C durant un quart d'heure environ et peser après refroidissement dans un dessiccateur.

5.2. Séparation de la fraction alcoolique

- 5.2.1. Préparation des plaques basiques: immerger les plaques au gel de silice (4.4), complètement, dans la solution éthanolique 0,2 N d'hydroxyde de potassium (4.5) durant 10 secondes, laisser agir ensuite; bien sécher sous hotte aspirante, pendant deux heures et mettre finalement à l'étuve à 100° C pendant une heure(note 2).

Retirer de l'étuve et conserver dans un dessiccateur à chlorure de calcium jusqu'au moment de l'emploi (les plaques ainsi traitées doivent être employées dans les quinze jours).

Note 2: L'emploi des plaques de gel de silice basiques pour la séparation de la fraction alcoolique élimine le besoin du traitement de l'insaponifiable avec l'alumine. De cette manière, tous les composés de nature acide (acides gras et autres) sont retenus sur la ligne de dépôt. On obtient ainsi la bande des alcools aliphatiques et terpéniques nettement séparée de la bande des stérols.

- 5.2.2. Introduire dans la cuve de développement un mélange hexane-éther éthylique 65/35 (V/ V) jusqu'à une hauteur d'environ 1 centimètre (*).

(*) Dans ces cas en particuliers, il faut employer le mélange éluant benzène-acétona 95/5 (v/v) pour obtenir une bonne séparation de bandes.

Fermer la cuve à l'aide d'un couvercle approprié et laisser ainsi pendant une demi-heure au moins, de façon à ce que l'équilibre liquide / vapeur s'établisse. Il est possible de fixer sur les surfaces intérieures de la cuve des bandes de papier filtre qui plongent dans l'éluant: cette précaution permet de réduire d'un tiers environ les temps de migration du front du liquide et d'obtenir une élution plus uniforme des composants (note 3).

Note 3: Afin d'avoir des conditions d'élution parfaitement reproductibles, le mélange doit être changé à chaque essai.

- 5.2.3. Préparer une solution à 5% environ d'insaponifiable (5.1.5) dans le chloroforme et, avec la microseringue de 100 microlitres, déposer sur la plaque chromatographique (5.2.1) à 2 centimètres environ d'un bord, 0,3 millilitre de la solution susdite en une ligne continue, la plus fine et uniforme possible. Dans l'alignement de la ligne de dépôt, déposer, à une des extrémités de la plaque, 2 à 3 microlitres de la solution de référence des alcools aliphatiques (4.11), dans le but d'identifier la bande des alcools aliphatiques lors du dernier développement.
- 5.2.4. Mettre la plaque dans la cuve de développement, préparée comme décrit au point 5.2.2. La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20° C. Fermer aussitôt la cuve avec le couvercle et laisser éluer jusqu'à ce que le front de solvant arrive à environ 1 centimètre du bord supérieur de la plaque. Enlever ensuite la plaque de la cuve de développement et faire évaporer le solvant dans un courant d'air chaud ou bien en laissant la plaque sécher sous hotte aspirante pendant un petit moment.
- 5.2.5. Vaporiser la plaque légèrement et uniformément avec la solution de dichloro-2' -7' fluorescéine. Identifier la bande des alcools aliphatiques par alignement avec la tache obtenue avec la solution de référence; délimiter la bande avec un crayon noir l'ensemble de la bande des alcools aliphatiques et de la bande immédiatement supérieure qui correspond aux alcools terpéniques.

Note 4: La précision faite de recueillir l'ensemble de la bande des alcools aliphatiques et de la bande des alcools terpéniques est due au fait que dans celle-ci, dans les conditions de la méthode, sont englobées des quantités significatives d'alcools aliphatiques. On trouvera en Annexe 1 un exemple de séparation.

- 5.2.6. Racler avec une spatule métallique le gel de silice compris dans la zone délimitée. Le matériau retiré, finement pulvérisé, est introduit dans l'ampoule filtrante (3.7); ajouter 10 millilitres de chloroforme chaud, mélanger soigneusement avec la spatule métallique et filtrer à l'aide du vide, puis recueillir le filtrat dans la fiole (3.8), reliée à l'ampoule filtrante.

Laver le gel de silice dans l'ampoule par trois fois à l'éther éthylique (environ 10 millilitres à chaque fois) et recueillir de même le filtrat dans la fiole adaptée à l'ampoule filtrante. Évaporer le filtrat jusqu'à l'amener à un volume d'environ 4 à 5 millilitres, transvaser la solution résiduelle dans le tube de 10 millilitres (3.9) pesé au préalable, porter à sec en chauffant légèrement dans un léger courant d'azote, reprendre avec quelques gouttes d'acétone, amener à nouveau à sec, mettre 10 minutes environ à l'étuve à 105° C, puis laisser refroidir au dessiccateur et peser.

Le résidu contenu dans le tube est constitué de la fraction alcoolique.

5.3. Préparation des triméthylsilyléthers

- 5.3.1. Ajouter, dans le tube contenant la fraction alcoolique, le réactif de silylation, constitué d'un mélange de pyridine-hexaméthylidisilazane- triméthylchlorosilane 9 / 3 / 1 (V / V / V) (note 5) dans une proportion de 50 microlitres par milligramme d'alcools aliphatiques, en évitant toute absorption d'humidité (note 6).

Note 5: Il existe dans le commerce des solutions prêtes à l'emploi; en outre, d'autres réactifs silanisants, tels que, par exemple, le bis-triméthylsilyltrifluoracétamide + 1 % de triméthylchlorosilane à diluer par un même volume de pyridine anhydre

Note 6: La formation éventuelle d'une légère opalescence est normale et n'est la cause d'aucun dérangement. La formation d'une floculation blanche ou l'apparition d'une coloration rose sont l'indice de la présence d'humidité ou d'altération du réactif. Dans ce cas, l'essai doit être répété.

- 5.3.2. Boucher le tube, agiter soigneusement (sans retourner) jusqu'à complète solubilisation des alcools aliphatiques. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes à température ambiante, puis centrifuger pendant quelques minutes: la solution limpide est prête pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

5.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.

- 5.4.1. Opérations préliminaires, conditionnement de la colonne

5.4.1.1. Installer la colonne dans le chromatographe en phase gazeuse, en reliant l'extrémité d'entrée à l'injecteur connecté au système de fractionnement et l'extrémité de sortie au détecteur. Effectuer les contrôles généraux du complexe de chromatographie en phase gazeuse (étanchéité du circuit des gaz, efficacité du détecteur, efficacité du système de fractionnement et du système d'enregistrement, etc.).

5.4.1.2. Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est conseillé de procéder à son conditionnement. Faire passer un léger flux de gaz au travers de cette colonne, puis allumer le complexe de chromatographie en phase gazeuse et commencer un chauffage graduel jusqu'à atteindre une température d'au moins 20° C supérieure à celle d'exercice (note 7). Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis porter le complexe aux conditions de fonctionnement (régulation du flux gazeux et de la séparation, allumage de la flamme, jonction avec l'enregistreur électronique, régulation de la température de la chambre pour la colonne, du détecteur et de l'initiateur etc.) et enregistrer le signal à une sensibilité au moins deux fois supérieure à celle prévue pour l'exécution de l'analyse. Le tracé de la ligne de base obtenue doit être linéaire, exempt de pic de quelque nature que ce soit et ne doit pas présenter de dérive. Une dérive rectiligne négative indique une étanchéité imparfaite des connexions de la colonne, une dérive positive indique un conditionnement insuffisant de la colonne.

Note 7: La température de conditionnement doit être toujours inférieure d'au moins 20° C à la température maximale prévue pour le liquide de répartition employé

5.4.2. Choix des conditions opératoires

5.4.2.1. Les conditions opératoires indicatives pour un système chromatographique avec injecteur de type diviseur de flux ("split") sont les suivantes:

- température de la colonne: début isotherme 8 minutes à 180° C, puis programme de 5° C par minute jusqu'à 260° C puis encore 15 minutes à 260° C,
- température de l'injecteur: 280° C,
- température du détecteur: 290° C,
- vitesse linéaire du gaz vecteur: hélium, 20 à 35 centimètres par seconde; hydrogène, 30 à 50 centimètres par seconde,
- rapport de splitage: de 1 / 50 à 1 / 100,
- sensibilité instrumentale: de 4 à 16 fois l'atténuation minimale,
- sensibilité d'enregistrement: 1 à 2 millivolts sur fond de l'échelle,
- vitesse du papier: 30 à 60 centimètres par heure,
- quantité de substance injectée: 0,5 à 1 microlitre de solution de TMSE.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et du chromatographe en phase gazeuse de façon à obtenir des chromatogrammes qui satisfassent aux conditions suivantes:

- le temps de rétention de l'alcool en C₂₆ doit être de 18 ± 5 minutes,
- le pic de l'alcool en C₂₂ doit arriver à 80 ± 20 % du fond de l'échelle pour l'huile d'olive et à 40 ± 20 % du fond de l'échelle pour l'huile de grignons d'olive.

5.4.2.2. Pour vérifier les conditions exigées ci-dessus, effectuer des injections répétées avec les échantillons de mélanges des TMSE des alcools et retoucher les conditions opératoires jusqu'à obtenir les meilleurs résultats.

5.4.2.3. Les paramètres d'intégration des pics doivent être imposés de façon à obtenir des valeurs correctes pour les pics qui sont pris en considération.

5.4.3. Exécution de l'analyse

5.4.3.1. Prélever, avec la microsiringue de 10 microlitres, 1 microlitre d'hexane, aspirer 0,5 microlitre d'air et successivement 0,5 à 1 microlitre 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 au travers de la membrane du complexe d'injection et, après 1 à 2 secondes, injecter rapidement et extraire ensuite l'aiguille lentement, après 5 secondes environ.

5.4.3.2. Procéder à l'enregistrement jusqu'à élution complète des TMSE des alcools aliphatiques présents. La ligne de base doit toujours correspondre aux conditions requises (5.4.1.2):

5.4.4. Identification des pics

L'identification des pics individuels est effectuée sur la base des temps de rétention et par comparaison avec le Mélange des TMSE des alcools aliphatiques, analysés dans les mêmes conditions.

L'Annexe 1 montre des chromatogrammes de la fraction alcoolique d'une huile d'olive raffinée.

5.4.5. Évaluation quantitative

5.4.5.1. Procéder, avec l'intégrateur, au calcul de l'aire des pics de l'1-eicosanol et des alcools aliphatiques C₂₂, C₂₄, C₂₆ et C₂₈.

5.4.5.2. Calculer le contenu en chaque alcool aliphatique individuel, en milligrammes pour 1000 grammes de matière grasse, comme suit :

$$\text{Alcool } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire du pic de l'alcools x;

A_s = aire du pic d'1-eicosanol;

m_s =. poids d'1-eicosanol ajouté, en milligrammes;

m = poids de l'échantillon prélevé pour la détermination, en grammes.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Rapporter les contenus en alcools aliphatiques simples en milligrammes pour 1000 grammes de matière grasse et leur somme comme «alcools aliphatiques totaux».

APPENDICE

Détermination de la vitesse linéaire du gaz

Dans le chromatographe en phase gazeuse, réglé aux conditions opératoires normales, injecter 1 à 3 microlitres de méthane (ou propane) et chronométrer le temps employé par le gaz pour parcourir la colonne, entre le moment de l'injection et celui de la sortie du pic (tM).

La vitesse linéaire en centimètres par seconde est donnée par L/tM , où L est la longueur de la colonne en centimètres et tM le temps chronométré en secondes.

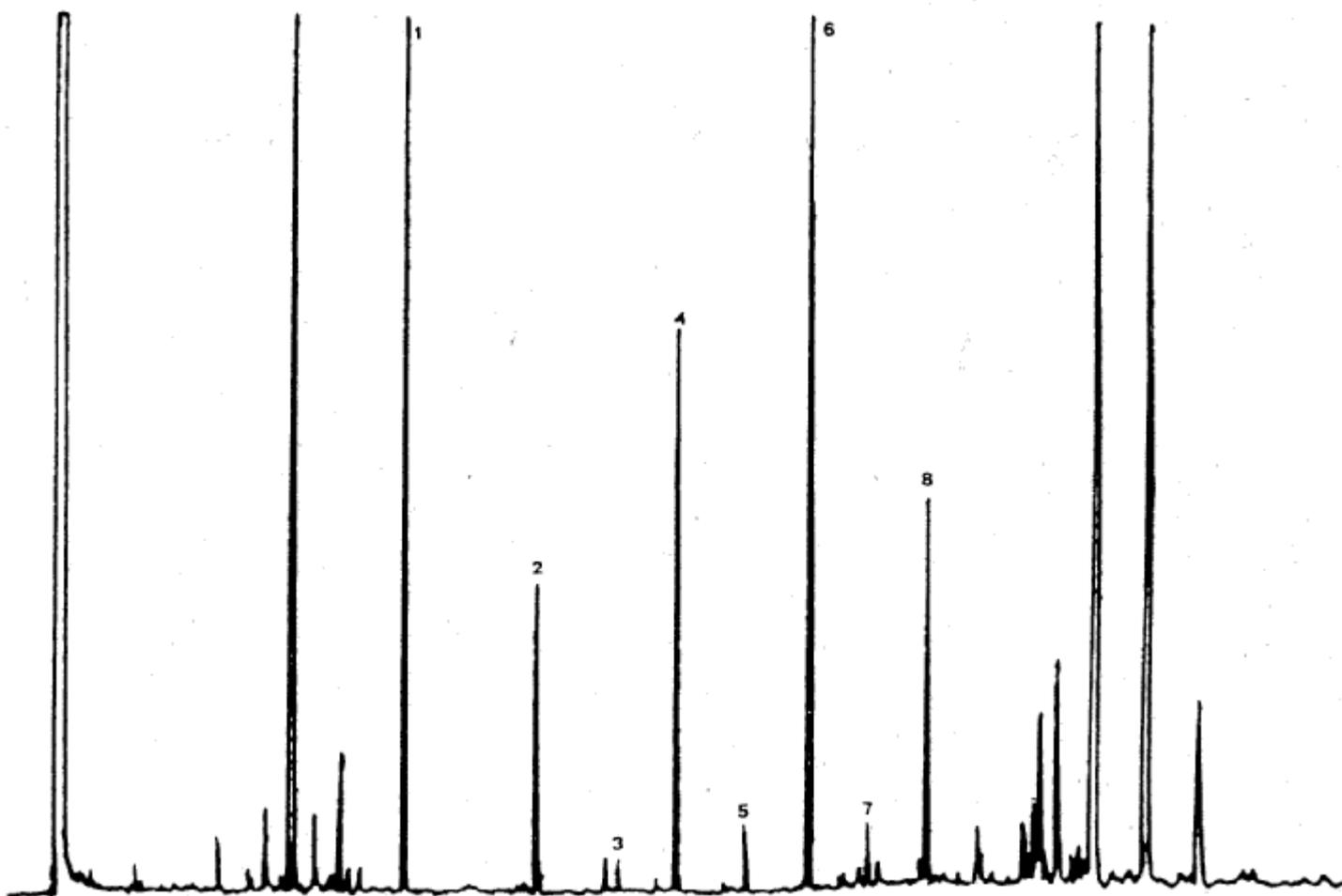


Figure 1- Chromatogramme de la fraction alcoolique d'une huile d'olive vierge

- | | |
|------------------|------------------|
| 1 = Eicosanol | 5 = Pentacosanol |
| 2 = Docosanol | 6 = Hexacosanol |
| 3 = Tricosanol | 7 = Heptacosanol |
| 4 = Tétracosanol | 8 = Octacosanol |

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 organisé en mai-juin 2003, coordonné par M. Arturo Cert, Instituto de la Grasa – Séville, a été réalisé par 15 laboratoires de 7 pays agréés par le Conseil Oléicole International à cette date.

L'essai a porté sur cinq échantillons d'huile d'olive vierge lampante (LVOO), d'huile de grignons d'olive brute obtenue de la centrifugation du grignons provenant du décanteur à deux phases (COPO) et de leurs mélanges:

- A: 100 % LVOO
- B: 85% LVOO + 15% COPO
- C: 75% LVOO + 25% COPO
- D: 60% LVOO + 40% COPO
- E: 100% COPO.

L'analyse statistique des résultats de l'essai collaboratif réalisée par le coordonnateur de l'essai a suivi les recommandations données dans "Collaborative Study Guidelines" dans *J. of AOAC International* 78, 143A-160A, 1995.. 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 ($S_R \times 100 / \text{mean}$)
- HoR** Horowitz' ratio $\left[\frac{RSD_{R\text{exp}}}{RSD_{R\text{teor}}} \right]$ where $RSD_{R\text{teor}} = 2^{(1-0.5\log C)}$ is the concentration of the compound expressed to the power 10.

Contenu en alcools aliphatiques totaux C22 + C24 + C26 + C28 (mg/kg)

	A	B	C	D	E
n	15	15	15	15	15
outliers	3	1	1	1	1
mean	245	363	440	541	997
r	16	28	29	36	54
S_r	5.8	10	10	13	19
RSD_r (%)	2.4	2.8	2.3	2.4	1.9
R	47	78	161	150	198
S_R	17	28	58	54	71
RSD_R(%)	6.9	7.6	13.1	9.9	7.1
HoR	0.35	0.41	0.72	0.56	0.44