



## **MÉTHODE D'ANALYSE**

### **DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION DES TRIACYLGLYCÉROLS ET DE LA COMPOSITION ET DE LA TENEUR EN DIACYLGLYCÉROLS DANS LES HUILES VÉGÉTALES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE**

#### **1 CHAMP D'APPLICATION**

Cette méthode décrit la détermination de la composition et de la teneur en triacylglycérols et de la composition et de la teneur en diacylglycérols (DAG) par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire dans les huiles végétales dont la teneur en acide laurique est inférieure à 1%.

#### **2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE**

La substance grasse, après ajout de l'étalon interne et du réactif de silanisation, est dissoute dans un réactif approprié et directement injectée dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse. Les triacylglycérols sont résolus sur la base de leur nombre d'atomes de carbone, tandis que les diacylglycérols sont résolus en fonction de leur nombre d'atomes de carbone et de leur structure. Les structures 1,2 présentent un temps de rétention plus faible que les structures 1,3.

Les structures diacylglycérols insaturés n'affectent pas le temps de rétention et les diglycérides saturés et insaturés sont donc élués ensemble. Les structures 1,2 et 1,3 des diacylglycérols sont identifiées par le temps de rétention et le pourcentage de la structure 1,2 est déterminé par le rapport des pics de diglycérides 1,2 sur la somme de tous les pics de diacylglycérols ; les diglycérides totaux sont quantifiés par le rapport entre la somme de tous les pics de diacylglycérols et l'étalon interne.

### 3 SIGNIFICATION DE LA DÉTERMINATION

Le profil des triglycérides est caractéristique de chaque type d'huile, car il dépend de la composition en acides gras, ainsi que des règles de biosynthèse, de sorte qu'il peut être utilisé pour vérifier la présence d'huiles étrangères.

La voie de biosynthèse des triglycérides se développe à travers les 1,2 diacylglycérols. Cependant, cette réaction n'est pas complète à 100% et il reste donc peu de diglycérides 1,2. Au cours du stockage ou des processus technologiques, une hydrolyse partielle peut se produire avec également une origine de diglycéride 1,3. Il est également possible d'obtenir ce résultat par la transposition de 1,2 à 1,3 diacylglycérol. La vitesse de cette transposition dépend de plusieurs facteurs. Au cours des traitements technologiques, une transposition de 1,2 en 1,3 se produit généralement jusqu'à atteindre l'équilibre ( $\approx 33\%$  de 1,2-DAG -  $66\%$  de 1,3-DAG). Par conséquent, l'évaluation du pourcentage de 1,2 est liée à la fraîcheur de l'huile d'olive ou aux traitements éventuellement effectués.

### 4 APPAREILLAGE

**4.1 Balance analytique** permettant d'effectuer des pesées avec une précision de +/- 0,1 mg.

**4.2 Chromatographe en phase gazeuse** pour colonnes capillaires, équipé d'un système d'injection « on column » en froid.

**4.2.1 Four thermostaté** avec programmation de la température.

**4.2.2 Injecteur à froid** pour injection sur colonne ou injecteur PTV avec insert sur colonne (gaine guidant l'aiguille de la seringue dans l'entrée de la colonne).

**4.2.3 Détecteur à ionisation de flamme** équipé d'un électromètre.

**4.2.4 Enregistreur-intégrateur** adapté à l'électromètre (4.2.3), avec une vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et une vitesse variable de déroulement du papier.

**4.2.5 Colonne capillaire en silice fondue** de 3 à 7 m, d'un diamètre intérieur de 0,25 à 0,32 mm, recouverte intérieurement de phase liquide SE 52, SE 54 (5% diphényl diméthyl polysiloxane), d'une épaisseur uniforme de 0,10 - 0,15  $\mu\text{m}$ .

(Note : la dégradation thermique peut affecter l'analyse en diminuant la récupération sur C<sub>58</sub> et C<sub>60</sub>, si cela se produit, une colonne plus courte doit être utilisée) - Normalement, une colonne de 5 m donne des résultats acceptables.

**4.3 Microseringue** de 10  $\mu\text{l}$  pour injection directe sur colonne.

**4.4 Microseringue** de 100  $\mu\text{l}$

**4.5 Matériel** courant de laboratoire.

## 5 RÉACTIFS

**5.1 Gaz vecteur :** hydrogène ou hélium, pur, pour la chromatographie en phase gazeuse.

**5.2 Gaz auxiliaires :**

- Hydrogène, pur, pour la chromatographie en phase gazeuse
- Air pur pour la chromatographie en phase gazeuse
- Azote, pur pour la chromatographie en phase gazeuse

**5.3 Réactif de silanisation :** mélanger des volumes égaux de :

- 1) pyridine
- 2) bistriméthylsilylfluoroacétamide/triméthylchlorosilane (BSTFA/TMCS 99:1, v/v).

Note : Des solutions prêtes à l'emploi sont disponibles. La solution de silanisation doit être fraîchement préparée.

**5.4 n-Heptane pour analyse**

**5.5 Échantillons de référence :** diglycérides et triglycérides purs et leurs mélanges, de composition connue.

**5.6 Méthyl-tert-butyl-éther**

**5.7 Solution d'échantillon de dinonadécanoïne (étalon interne), 0,1 % p/v dans du méthyl tert-butyl éther.**

## 6 PROCÉDURE

### 6.1 Vérification de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse et de l'état de la colonne capillaire

Installer la colonne dans le chromatographe en phase gazeuse (4.2), 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 et du système d'enregistrement, etc.).

Faire circuler un léger flux de gaz dans la colonne, puis allumer le chromatographe. Chauffer progressivement jusqu'à atteindre une température de 350 °C après environ 4 heures.

Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis régler l'appareil aux conditions d'utilisation (régler le débit de gaz, allumer la flamme, connecter l'enregistreur électronique, régler

la température du four pour la colonne, régler le détecteur, etc.). Enregistrer le signal à une sensibilité au moins deux fois supérieure à celle requise pour l'analyse. Le tracé de la ligne de base 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.

## 6.2 Choix des conditions de fonctionnement

Les conditions de fonctionnement sont généralement les suivantes, *mais le programme de température peut être modifié en fonction des caractéristiques de la colonne et de l'instrument* (Note 1) :

- La température de l'injecteur doit être inférieure d'au moins 10 °C à la température de vaporisation (99 °C) du solvant utilisé (n-Heptane)
- Température du détecteur : 350 °C ;                      20 °C/min                      5 °C/min
- Température de la colonne : 80 °C au début (1') -----> 220 °C -----> 340 °C (10')
- Gaz vecteur : hydrogène ou hélium, réglé à la vitesse linéaire adéquate pour le gaz choisi
- Quantité de substance injectée : 0,5 - 1 µl de solution préparée comme indiqué au point 6.3

*Note 1 : Pour calculer correctement le rapport 1,2 / DAG total, la résolution doit pouvoir au moins séparer chaque paire d'isomères jusqu'à une vallée de 10 %.*

## 6.3 Procédure d'analyse

Peser (4.1) avec précision environ 100 mg d'huile dans un tube conique à fond de verre et ajouter 1 ml de solution étalon interne (5.7). Agiter l'échantillon jusqu'à obtention d'une solution complète, prélever avec une microsiringue (4.4) 20 à 30 µl de solution, la placer dans un nouveau tube de verre (avec un bouchon) et la sécher par un léger courant d'azote.

Ajouter 200 µl de réactif de silanisation et laisser reposer le mélange jusqu'à ce que la silanisation soit complète (Note 2). Sécher par un léger flux d'azote (note 1), ajouter 2 ml de n-Heptane et agiter. Injecter (4.3) de 0,5 à 1 µl de solution, dans les conditions indiquées au point 6.2.

*Note 2 : Pour déterminer si la dérivatisation est terminée, analyser des parties aliquotes de l'échantillon à des intervalles de temps déterminés jusqu'à ce que l'on n'observe plus d'augmentation des pics de produit. Normalement, à température ambiante, la silanisation est complète en 20 minutes. Le chauffage de l'échantillon à 60°C pendant 20 à 30 minutes doit être évalué lorsque la dérivatisation n'est pas complète.*

## 6.4 Identification des pics

L'identification des pics de triglycérides est réalisée à partir des temps de rétention en les comparant à des mélanges de composition connue. Ils sont élués dans l'ordre suivant : C<sub>50</sub>, C<sub>52</sub>, C<sub>54</sub>, C<sub>56</sub>, C<sub>58</sub>, C<sub>60</sub>, C<sub>62</sub>.

L'identification des pics de diglycérides est réalisée à partir des temps de rétention en les comparant à des mélanges de diacylglycérols connus. Les diglycérides sont élués dans l'ordre suivant : 1,2 C<sub>32</sub> ; 1,3 C<sub>32</sub> ; 1,2 C<sub>34</sub> ; 1,3 C<sub>34</sub> ; 1,2 C<sub>36</sub> ; 1,3 C<sub>36</sub> (voir Figures 1, 2, 3 et 4).

### 6.5 Détermination de la teneur en pourcentage de chaque triacylglycérol

Calculer les aires de chaque pic à l'aide d'un intégrateur électronique.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de C<sub>50</sub>, C<sub>52</sub>, C<sub>54</sub>, C<sub>56</sub>, C<sub>58</sub>, C<sub>60</sub>, C<sub>62</sub>.

Les autres pics révélés par la chromatographie en phase gazeuse ne doivent pas être pris en compte.

Tous les triacylglycérols, y compris ceux qui se trouvent entre les pics principaux, doivent être intégrés.

Chaque triglycéride impair (voir Figure 5) est combiné à celui qui le précède afin que la somme de tous les triglycérides soit normalisée à 100%.

### 6.6. Détermination de la teneur en pourcentage de chaque 1,2 diacylglycérol

Calculer les aires de chaque pic à l'aide d'un intégrateur électronique.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de 1,2 C<sub>32</sub>, 1,3 C<sub>32</sub>, 1,2 C<sub>34</sub>, 1,3 C<sub>34</sub>, 1,2 C<sub>36</sub>, 1,3 C<sub>36</sub> sur la somme des aires de DAG. Les autres pics éventuels révélés par la chromatographie en phase gazeuse n'ont pas été pris en compte :

$$\% \text{ de diglycérides simples} = \frac{A_x}{\sum A_{DAG}}$$

Où :

A<sub>x</sub> : aire du pic correspondant au diglycéride x,

$\sum A_{DAG}$  : somme des aires de la totalité des pics de diglycérides.

Les résultats sont exprimés avec une décimale.

### 6.7 Détermination du pourcentage de poids de la teneur totale en diacylglycérols

En utilisant l'intégrateur, calculer les aires de l'étalon interne et des composés de diglycérides, en ne considérant que les pics signalés au point 6.5 précédent.

Calculer chaque diglycéride, en % de poids (gr/100g) de matière grasse, comme suit :

$$\text{Diglycéride simple, \% en poids (g./100g)} = \frac{A_x \times m_s \times 100}{A_s \times m}$$

Où :

A<sub>x</sub> : aire du pic correspondant à un seul diglycéride,

A<sub>s</sub> : aire du pic correspondant à l'étalon interne,

m<sub>s</sub> : quantité ajoutée (mg) d'étalon interne,

m : quantité (mg) d'échantillon à prélever pour la détermination.

Les résultats sont exprimés avec une décimale.

## 7 EXPRESSION DES RÉSULTATS

***Pourcentage d'un seul triglycéride.*** Calculer la somme des pourcentages de triglycérides. Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

***Pourcentage de diglycérides 1,2.*** Calculer la somme des pourcentages de diglycérides 1,2. Les résultats sont exprimés avec une décimale.

***Pourcentage de poids.*** Additionner les quantités de tous les diglycérides détectés. Les résultats sont exprimés avec une décimale.

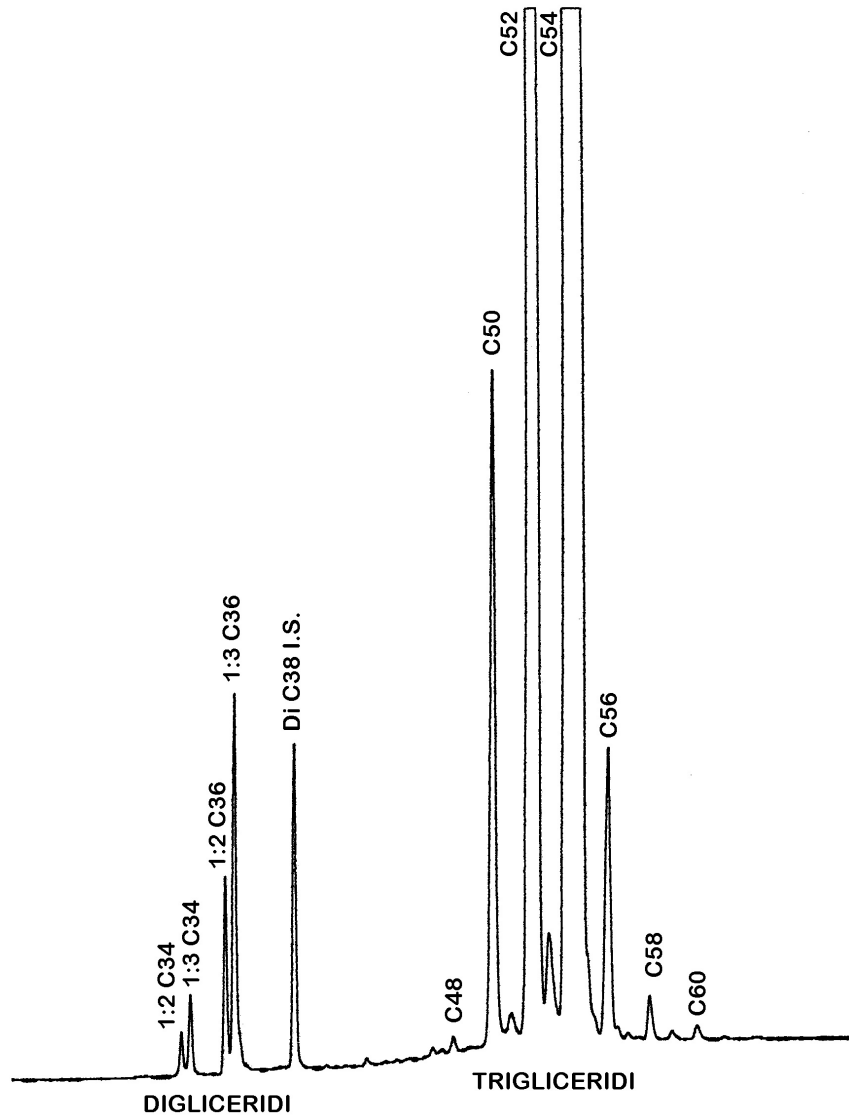


Figure 1 : Chromatogramme du diacylglycérol et du triacylglycérol d'un échantillon d'huile d'olive.

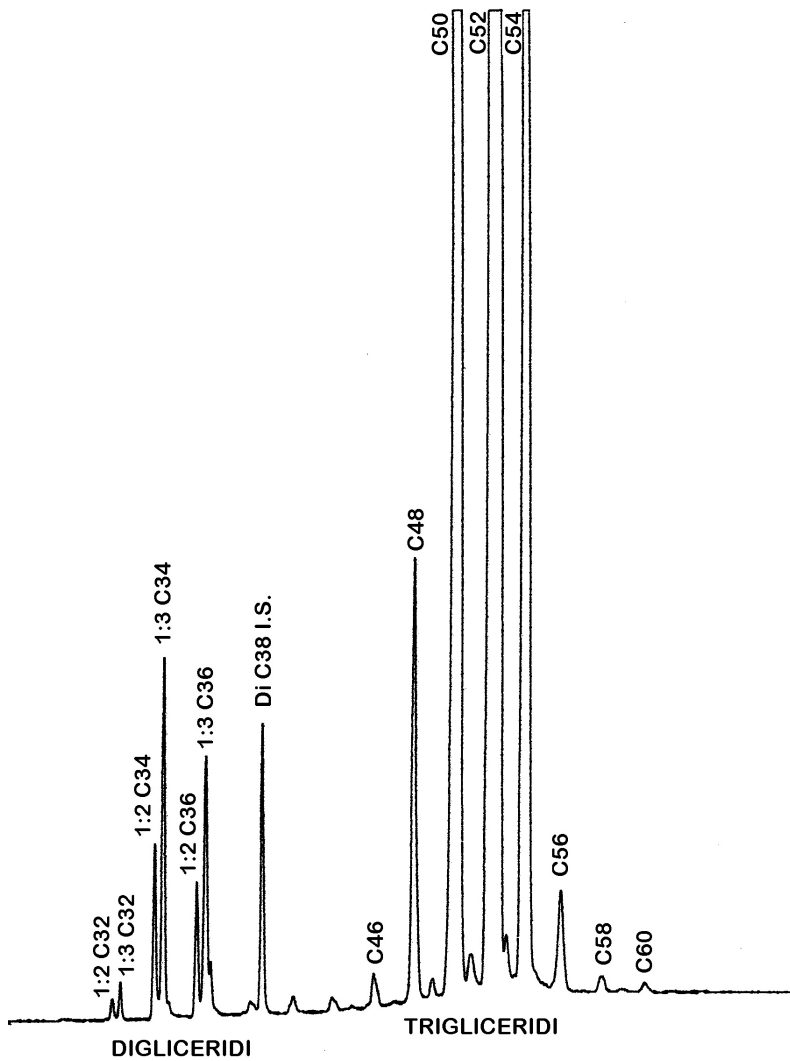


Figure 2 : Chromatogramme du diacylglycérol et du triacylglycérol d'un échantillon d'oléine de palme.



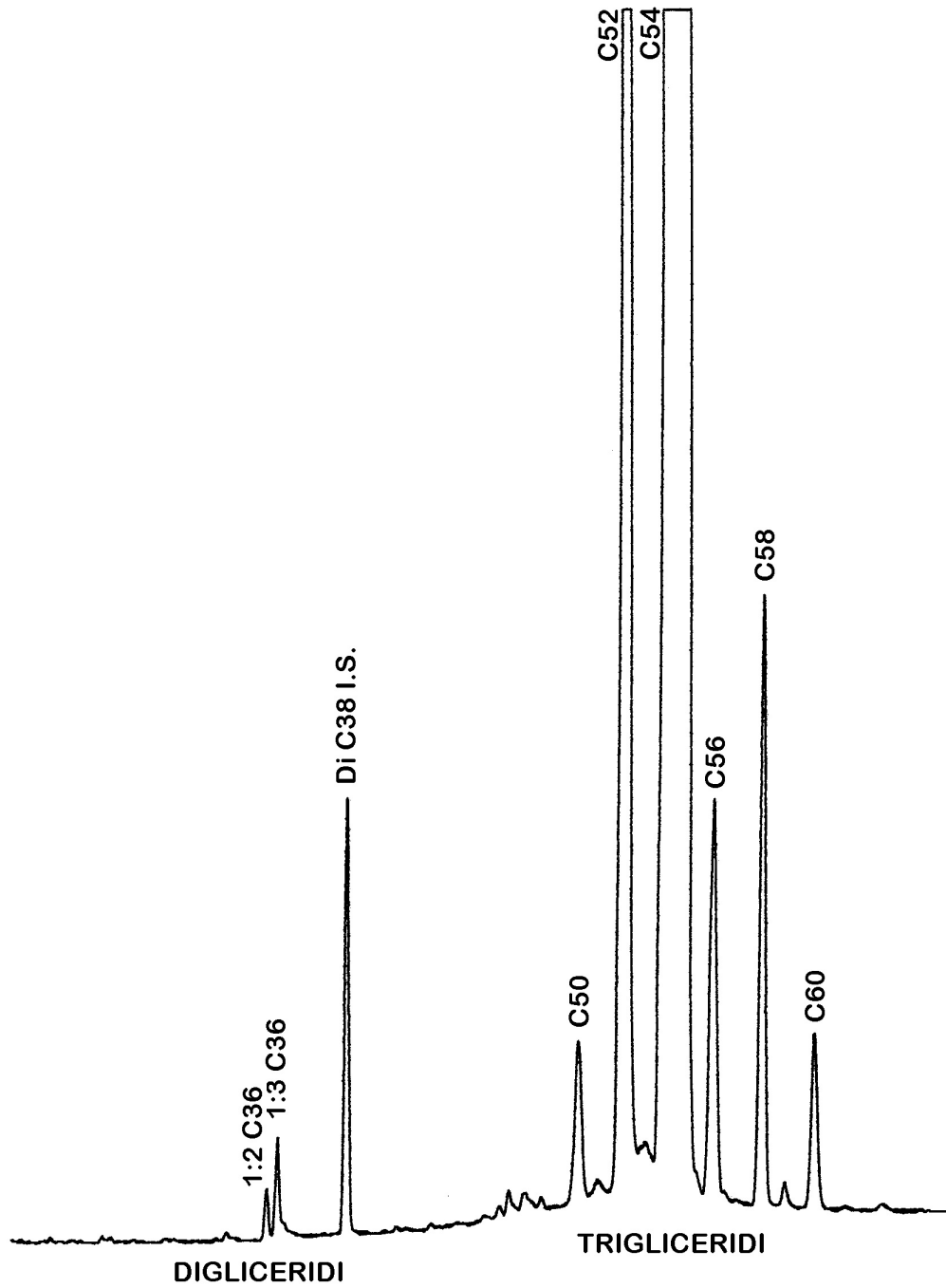


Figure 3 : Chromatogramme du diacylglycérol et du triacylglycérol d'un échantillon d'huile de tournesol à haute teneur en acide oléique.

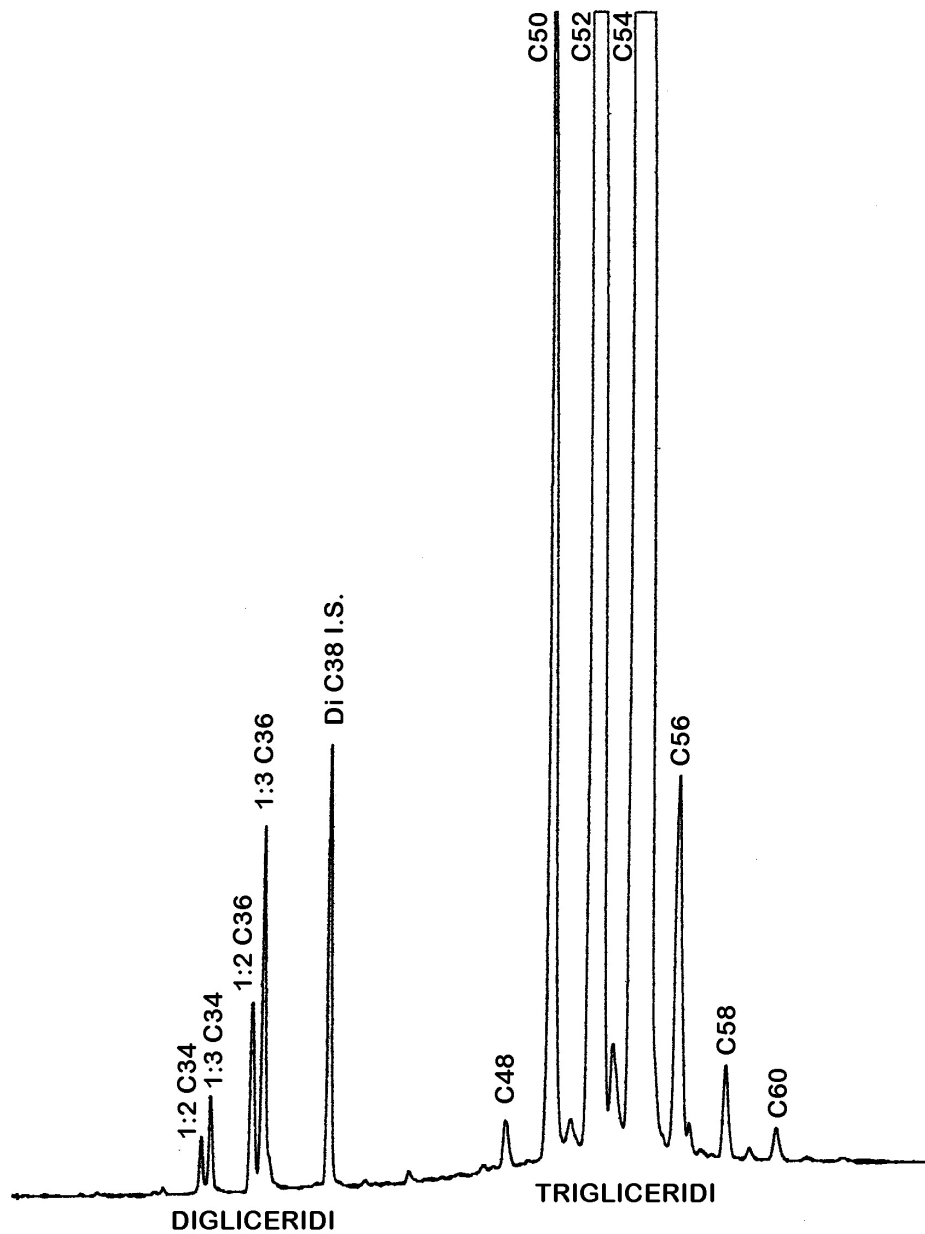


Figure 4 : Chromatogramme du diacylglycérol et du triacylglycérol d'une huile d'olive mélangée à de l'oléine de palme et à de l'huile de tournesol à haute teneur en acide oléique.

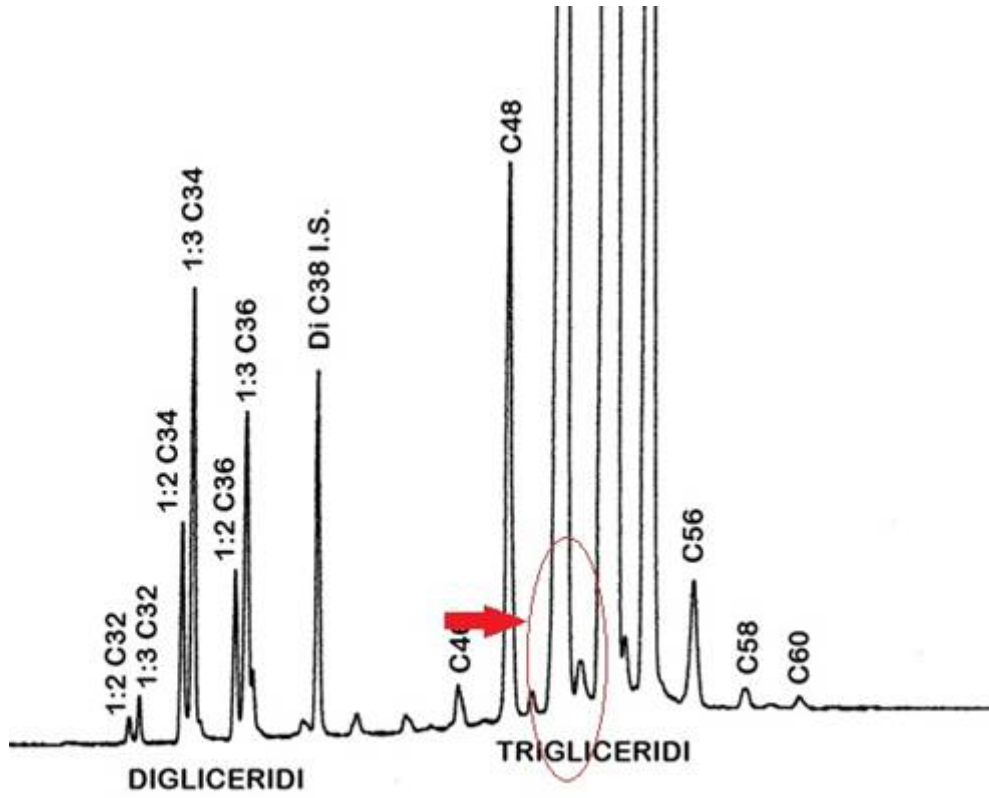


Figure 5 : Exemple d'intégration des pics

VALEURS DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION  
DES TRIACYLGLYCÉROLS ET DE LA COMPOSITION ET DE LA TENEUR DES  
DIACYLGLYCÉROLS

### 1. Analyse des résultats des essais circulaires

Les valeurs de précision de la méthode sont indiquées dans le tableau suivant.

L'essai circulaire a été organisé par le Secrétariat exécutif en 2013, avec la participation de dix laboratoires de cinq pays.

L'essai a été effectué en double sur cinq échantillons :

- Échantillon 1 - Huile d'olive vierge extra avec 5% d'huiles étrangères (tournesol desterolate, avocat, huiles d'arachide, de colza et de noisette)
- Echantillon 2 - Huile d'olive vierge extra avec 10% d'huiles étrangères (tournesol desterolate, avocat, huiles d'arachide, de colza et de noisette)
- Échantillon 3 - Huile d'olive vierge extra de haute qualité
- Échantillon 4 - Huile d'olive vierge extra au détail
- Échantillon 5 - Huile d'olive vierge extra avec huiles de palme, de tournesol desterolate, d'avocat et de noisette

L'analyse statistique des résultats de l'essai a été effectuée conformément aux règles établies dans les normes ISO 5725 « **Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure** ». Les valeurs aberrantes ont été déterminées 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 éléments ci-après, dont la signification est la suivante :

<b>n</b>	Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
<b>outliers</b>	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
<b>mean</b>	Moyenne des résultats acceptés
<b>r</b>	Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et pendant un court intervalle de temps (répétabilité)
<b>Sr</b>	Écart-type de la répétabilité
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	Coefficient de variation de la répétabilité ( $Sr \times 100 / \text{mean}$ )
<b>R</b>	Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus à l'aide de la même méthode

sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant un appareillage différent (Reproductibilité)

**S<sub>R</sub>** Écart-type de la reproductibilité

**RSD<sub>R</sub> (%)** Coefficient de variation de la reproductibilité (S<sub>R</sub> x 100 / mean)

**Pourcentage de triglycérides simples (%)**

**TAG 48**

	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5
<b>N</b>	10	10	10	10	10
<b>outliers</b>	1	1	2	2	1
<b>mean</b>	0,088	0,115	0,044	0,055	0,224
<b>r</b>	0,023	0,021	0,020	0,020	0,044
<b>S<sub>r</sub></b>	0,0083	0,0074	0,0070	0,0070	0,0157
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	9,4%	6,5%	16,0%	12,8%	7,0%
<b>R</b>	0,0545	0,0808	0,0683	0,0589	0,0858
<b>S<sub>R</sub></b>	0,0195	0,0289	0,0244	0,0210	0,0306
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	22,0%	25,2%	55,9%	38,4%	13,7%

**TAG 58**

	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5
<b>N</b>	10	10	10	10	10
<b>outliers</b>	0	0	0	0	1
<b>mean</b>	0,305	0,405	0,255	0,221	0,369
<b>r</b>	0,034	0,062	0,077	0,029	0,040
<b>S<sub>r</sub></b>	0,012	0,022	0,028	0,010	0,014
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	3,9%	5,5%	0,8%	4,7%	3,8%
<b>R</b>	0,15	0,19	0,15	0,14	0,19
<b>S<sub>R</sub></b>	0,052	0,068	0,054	0,050	0,068
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	17,0%	16,8%	21,2%	22,6%	18,4%

**Pourcentage de diglycérides 1,2 (%)****1,2 DAG**

	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5
<b>N</b>	10	10	10	9	8
<b>outliers</b>	1	1	1	1	0
<b>mean</b>	36,83	31,36	49,85	29,43	29,24
<b>r</b>	1,5	4,3	4,8	4,8	1,7
<b>S<sub>r</sub></b>	0,53	1,5	1,7	1,7	0,62
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	1,4%	4,9%	3,5%	5,9%	2,1%
<b>R</b>	16	11	6,9	7,9	9,4
<b>S<sub>R</sub></b>	5,8	4,0	2,5	2,8	3,4
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	15,7%	12,8%	5,0%	9,5%	11,6%

**Teneur en diglycérides (g/100g)****Total DAG**

	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5
<b>N</b>	10	10	10	10	10
<b>outliers</b>	1	1	1	1	1
<b>mean</b>	1,48	1,62	1,23	1,47	2,33
<b>r</b>	0,16	0,21	0,19	0,15	0,21
<b>S<sub>r</sub></b>	0,058	0,074	0,067	0,053	0,076
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	3,9%	4,6%	5,5%	3,6%	3,2%
<b>R</b>	0,45	0,59	0,48	0,50	0,67
<b>S<sub>R</sub></b>	0,16	0,21	0,17	0,18	0,24
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	10,8%	13,0%	13,8%	12,2%	10,3%

### **3. 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: 1994 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

---