

Analyse des esters méthyliques d'acides gras (FAME) avec le GC Agilent 8890 et son application aux échantillons réels

Auteur

Jie Zhang
Agilent Technologies, Inc.
Shanghai, Chine

Résumé

Dans cette note d'application, les méthodes GB 5009.168-2016¹ et 5009.257-2016² ont été appliquées à l'analyse des FAME en utilisant un GC Agilent 8890 équipé d'une longue colonne polaire. La méthode GC a été optimisée pour la séparation en 80 minutes de 37 FAME représentatifs et de 21 FAME *trans* représentatifs. La reproductibilité des temps de rétention (TR) et des aires des pics, ainsi que la linéarité, ont été évaluées préalablement à l'analyse d'un mélange de FAME préparé à partir d'échantillons d'huile réels.

Introduction

Les matières grasses sont principalement constituées de triesters d'acides gras et de glycérol appelés triglycérides. Pour l'étiquetage nutritionnel, les matières grasses sont définies comme la somme des acides gras contenus dans les aliments, indépendamment de leur origine, exprimée en tant qu'équivalents triglycérides. Les différents types d'acides gras sont classés en fonction de leur degré d'insaturation : saturés, monoinsaturés et polyinsaturés. Les acides gras *trans* sont des acides gras insaturés contenant au moins une double liaison *trans* non conjuguée.

La teneur en matières grasses des aliments est un aspect de la nutrition qui a toujours été largement discuté et surveillé. De nombreux consommateurs s'intéressent à la quantité de matières grasses dans les aliments en termes de santé, de nutrition, de perte de poids, et plus encore.

Un certain nombre de méthodes, telles que GB 5009.168-2016¹ et GB 5009.257-2016², ont été développées pour l'analyse des matières grasses dans les aliments. Ces deux méthodes décrivent des approches pour l'extraction des matières grasses à partir de différentes matrices alimentaires, la *trans*-estérification des acides gras en esters méthyliques d'acides gras (FAME) et des méthodes GC recommandées pour leur séparation et le traitement des données. La méthode 168 porte principalement sur l'analyse de 37 acides gras représentatifs, tandis que la méthode 257 porte sur l'analyse des acides gras *trans*.

Matériel

Équipement

- GC Agilent 8890 avec injecteur split/splitless et détecteur à ionisation de flamme (FID).
- Passeur automatique de liquides (ALS) Agilent série 7693A (réf. G4567A).

Produits chimiques

- Mélange de 37 FAME (CDAA-252795-MIX-1 mL), acheté auprès d'ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc., contenant des FAME en C4–C24 dans une plage de concentration de 200 à 400 ng/μL.

- Mélanges de 13 FAME *trans* (CDAA-2527,15 à 100 mg) et de huit esters méthyliques *cis/trans* de l'acide octadécatriénoïque (CDAB-CRM47792), achetés auprès d'ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc. La concentration de chaque composé dans les deux mélanges était de 3 à 30 % en poids.

Échantillons

Des échantillons d'huile de soja, d'huile d'arachide et d'huile de sésame ont été fournis et préparés conformément à la méthode GB 5009.168-2016 par le Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research.

Paramètres instrumentaux

Tableau 1. Paramètres de l'instrument.

Système de GC	GC 8890A
Injecteur S/SL	250 °C, rapport de division de 100:1,
Insert	Avec division, ultra inerte, avec laine de verre, à faible perte de charge (réf. 5190-2295)
Programme de température du four	100 °C (13 minutes), 10 °C/min jusqu'à 180 °C (6 minutes), 1 °C/min jusqu'à 200 °C (20 minutes), 4 °C/min jusqu'à 230 °C (7 minutes)
Gaz vecteur	Azote, 40 psi, mode pression constante
Colonne	Agilent HP-88, 100 m x 0,25 mm, 0,20 μm (réf. 112-88A7)
Détecteur	280 °C, H ₂ : 40 mL/min Air : 400 mL/min Gaz d'appoint : 25 mL/min

Résultats et discussion

Le programme de température du four recommandé dans la méthode GB 5009.168-2016 a été utilisé. Les analyses ont été effectuées en mode pression constante et la pression en tête de colonne a été optimisée à 40 psi afin de séparer les paires critiques C20:0/C20:3 n6 avec une résolution minimale de 1,3, dépassant l'exigence de résolution de 1,25 spécifiée dans la méthode.

Un mélange étalon de 37 FAME a été dilué à une concentration de 50 à 100 ng/μL pour chaque composé et utilisé pour évaluer la reproductibilité du système. Ce mélange étalon a été choisi afin de se conformer à la méthode GB et parce qu'il a été conçu pour imiter la composition en acides gras de nombreux échantillons alimentaires. Le programme de montée en température du four était plutôt long et les 37 FAME ont été séparés en 81 minutes (Figure 1). Tous les composés ont été séparés avec une bonne résolution. La superposition des chromatogrammes de six injections a démontré l'excellente reproductibilité des aires des pics et des temps de rétention (Figure 1). Le TR, la surface de pic et la précision sont indiqués dans le Tableau 2 pour chaque

composé. La reproductibilité des surfaces était comprise dans une plage de 1,1 à 3,4 % (Figure 2), avec une RSD% atteignant 4,0 % pour l'un des composés. Puisque l'hexane a été utilisé comme solvant d'échantillon et que le temps d'analyse était supérieur à 80 minutes pour chaque injection, l'évaporation de l'échantillon (en particulier du solvant) pendant la séparation a entraîné une légère variation dans sa concentration.

La quantité d'échantillon chargée sur la colonne était comprise dans une plage de 0,5 à 1 ng pour chaque composé. En raison de cette faible quantité d'échantillon et de l'évaporation du solvant, la RSD% des surfaces de pics a légèrement dépassé 2 % mais elle était tout de même conforme à l'exigence de quantification.

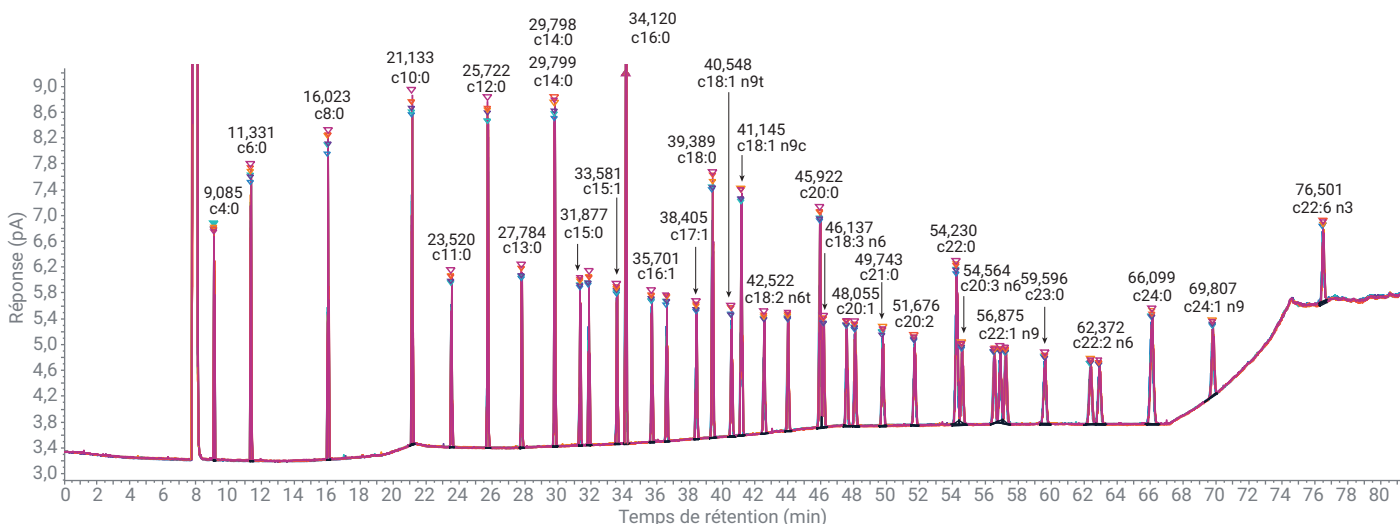


Figure 1. Superposition des chromatogrammes de six injections de 37 FAME sur un GC 8890.

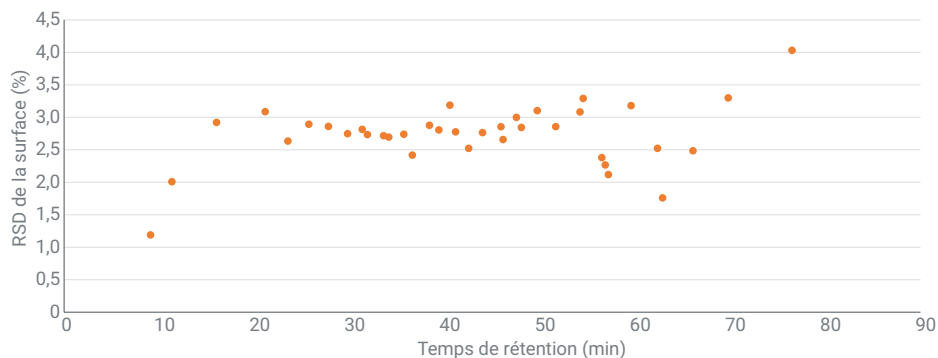


Figure 2. Précision des aires des pics des 37 FAME sur six injections.

La reproductibilité des temps de rétention était de 0,01 à 0,03 % (Figure 3). Bien que l'obtention d'une excellente reproductibilité du système ait été compliquée par le long temps d'analyse, le GC 8890A a permis de contrôler précisément la température du four, la pression de l'injecteur et les débits au niveau du détecteur, rendant possible l'obtention de chromatogrammes reproductibles et assurant la fiabilité de l'identification des composés.

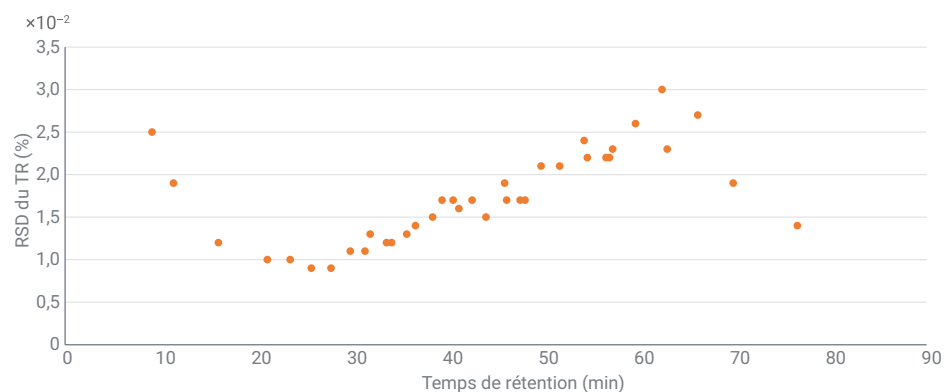


Figure 3. Précision des TR des 37 FAME sur six injections.

Tableau 2. TR, surfaces des pics et leur précision pour les 37 composés sur six injections.

Composé	TR moyen (min)	RSD des TR (%)	Surface moyenne	RSD des surfaces (%)
C4:0	9,086	0,025	6,903	1,189
C6:0	11,331	0,019	12,795	2,008
C8:0	16,022	0,012	16,599	2,921
C10:0	21,131	0,01	17,995	3,086
C11:0	23,518	0,01	9,365	2,633
C12:0	25,721	0,009	18,702	2,893
C13:0	27,783	0,009	9,655	2,859
C14:0	29,796	0,011	19,362	2,747
C14:1	31,333	0,011	9,57	2,813
C15:0	31,874	0,013	9,9	2,733
C15:1	33,58	0,012	9,818	2,716
C16:0	34,119	0,012	29,97	2,694
C16:1	35,699	0,013	9,999	2,739
C17:0	36,602	0,014	10,125	2,417
C17:1	38,4	0,015	10,053	2,876
C18:0	39,385	0,017	20,432	2,805
C18:1 n9t	40,544	0,017	10,294	3,186
C18:1 n9c	41,142	0,016	20,389	2,776
C18:2 n6t	42,519	0,017	10,188	2,522
C18:2 n6c	43,972	0,015	10,363	2,763
C20:0	45,919	0,019	20,719	2,854
C18:3 n6	46,135	0,017	10,003	2,657

Composé	TR moyen (min)	RSD des TR (%)	Surface moyenne	RSD des surfaces (%)
C18:3 n3	47,54	0,017	10,167	2,998
C20:1	48,052	0,017	10,354	2,843
C21:0	49,731	0,021	10,554	3,102
C20:2	51,671	0,021	10,302	2,855
C22:0	54,225	0,024	21,046	3,082
C20:3 n6	54,554	0,022	10,28	3,29
C20:3 n3	56,514	0,022	10,244	2,379
C22:1 n9	56,871	0,022	10,273	2,266
C20:4 n6	57,204	0,023	10,633	2,117
C23:0	59,588	0,026	10,693	3,179
C22:2 n6	62,36	0,03	10,415	2,521
C20:5 n3	62,903	0,023	10,177	1,758
C24:0	66,093	0,027	21,326	2,484
C24:1 n9	69,797	0,019	10,863	3,298
C22:6 n3	76,499	0,014	9,456	4,03

La linéarité du système a été évaluée en calculant l'écart-type relatif (RSD en %) du facteur de réponse (FR) des FAME C18:1c et C18:2c à cinq niveaux de concentration différents. Comme indiqué dans le Tableau 3, la RSD% du facteur de réponse est d'environ 4 % pour ces deux composés, démontrant l'excellente linéarité en termes de réponse des pics. Certains laboratoires utilisent la méthode d'étalonnage externe pour la quantification. Une bonne linéarité du détecteur sur une large plage de concentration peut garantir la précision de la quantification même lorsqu'une méthode d'étalonnage externe à un seul point est utilisée.

La Figure 4 illustre la séparation d'un mélange de 13 FAME *trans* et de 8 isomères d'esters méthyliques de l'acide octadécatriénoïque. Les résultats ont été obtenus conformément à la méthode GB 5009.257-2016. Le programme de température du four était le même que pour l'analyse du mélange de 37 FAME. Les huit isomères des FAME C18:3 *trans* sont particulièrement difficiles à séparer, d'autant plus que les autres FAME présents avec les FAME C18:3 doivent être séparés au cours de la même analyse. Toutefois, la colonne HP-88 de 100 m a permis de séparer les huit isomères des esters méthyliques de l'acide

octadécatriénoïque, comme démontré par les huit pics obtenus dans la partie agrandie du chromatogramme (Figure 5). Bien que la séparation à la ligne de base n'ait pas été obtenue, la comparaison avec le chromatogramme de référence de la méthode GB 5009.257-2016 montre que la résolution se situait dans des limites acceptables. De plus, l'ester méthylique de l'acide *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15-octadécatriénoïque a été bien séparé des sept autres isomères *trans*. Il s'agit d'un résultat essentiel d'un point de vue pratique compte tenu de l'importance des acides gras *trans* dans l'étiquetage nutritionnel.

Tableau 3. Linéarité de la réponse (surface de pic) pour C18:1-*cis* et C18:2-*cis*.

Composé	Concentration	Aire (pA*S)	FR (réponse par quantité)	RSD en % des FR
C18:1- <i>cis</i>	1,7 ppm	0,330	0,194	4,7 %
	17 ppm	3,002	0,177	
	170 ppm	29,152	0,171	
	1 700 ppm	301,107	0,177	
	17 000 ppm	3 065,390	0,180	
C18:2- <i>cis</i>	0,86 ppm	0,155	0,180	3,0 %
	8,6 ppm	1,628	0,189	
	86 ppm	14,833	0,172	
	860 ppm	152,562	0,177	
	8 600 ppm	1 550,921	0,180	

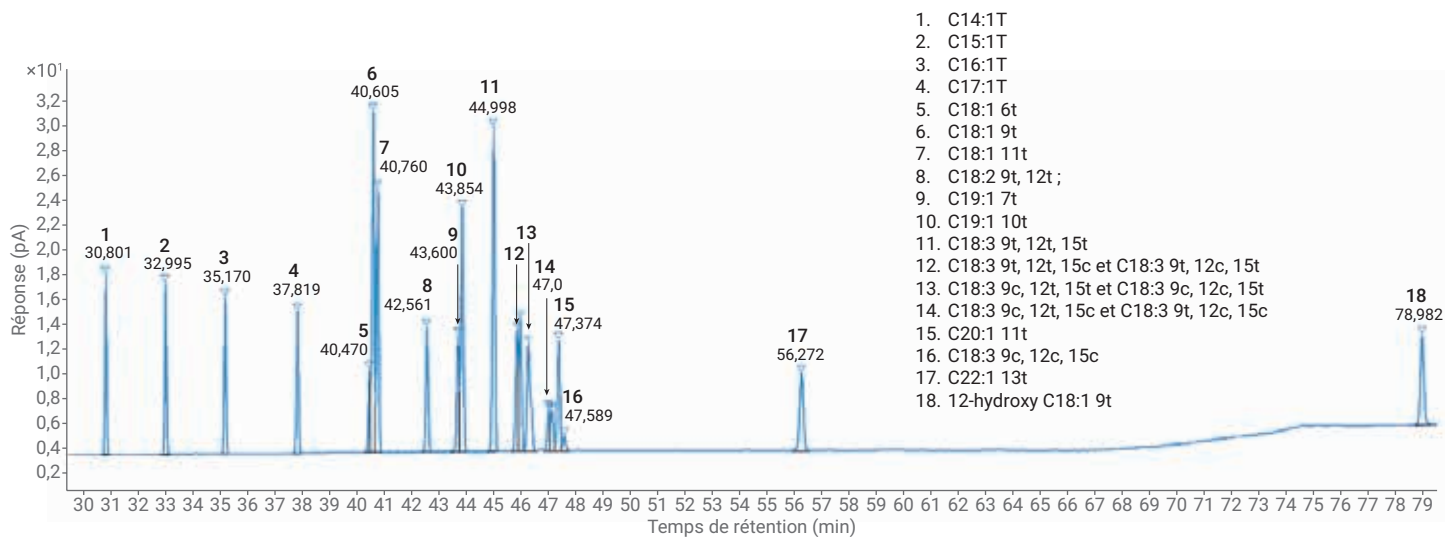


Figure 4. Chromatogramme de 21 FAME *trans* obtenu avec une colonne HP-88.

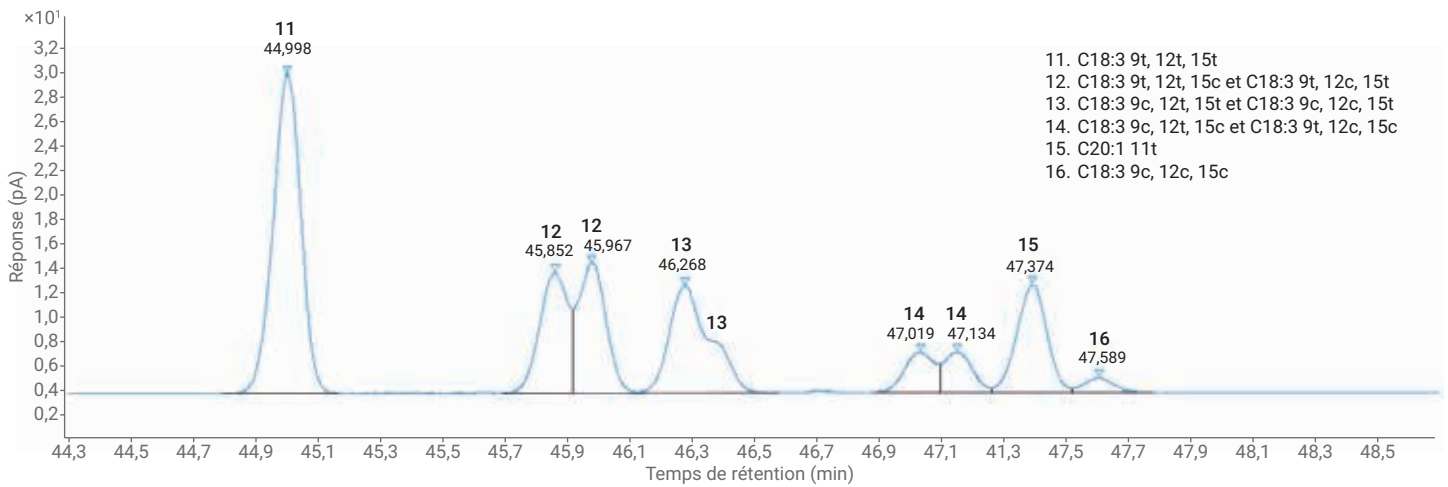


Figure 5. Agrandissement du chromatogramme pour les isomères des esters méthyliques de l'acide octadécatriénoïque.

Des échantillons d'huile réels, notamment d'huile de soja, d'huile d'arachide et d'huile de sésame, ont été extraits, dérivatisés et analysés avec un GC 8890 conformément à la méthode GB 5009.168-2016. Les Figures 6A, 6B et 6C présentent les chromatogrammes obtenus. C16:0, C18:0, C18:1 n9c, C18:2 n6c, C18:3 n3 et C20:1 étaient les principaux acides gras identifiés dans les trois types d'échantillons

d'huile (les légendes en rouge dans les Figures 6A, 6B et 6C correspondent à des composés répertoriés dans la table d'étalonnage de la méthode qui n'ont pas été identifiés dans les échantillons réels).

Il existe une solution d'analyse rapide des FAME qui permet de séparer en 10 minutes les 37 FAME représentatifs sur une colonne courte de polycyanopropyle-siloxane³. Cependant, cette analyse rapide présente certaines limitations

pour la séparation des FAME *cis* et *trans*. La méthode d'analyse des FAME en 60 à 80 minutes à l'aide d'une longue colonne polaire a été développée pour les échantillons requérant la séparation d'acides gras *cis/trans* difficiles ou d'autres isomères récalcitrants. Dans certaines applications, telles que les tests de qualité de l'huile d'olive vierge extra, l'efficacité de la séparation des FAME *cis/trans* l'emporte sur le temps d'analyse.

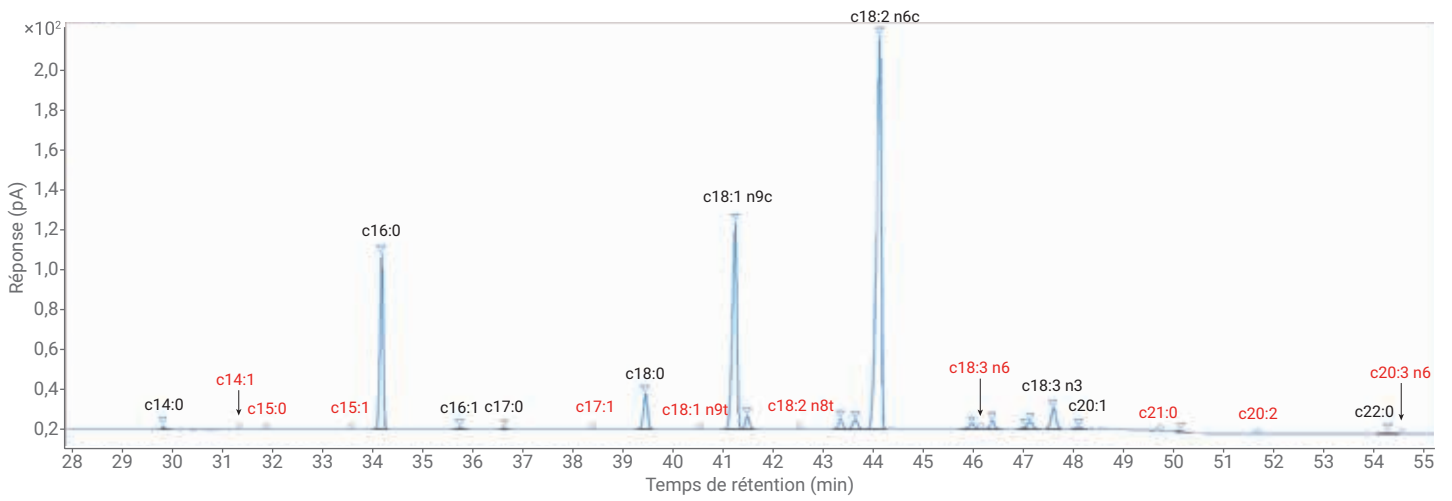


Figure 6A. Chromatogramme pour l'analyse de l'huile de sésame.

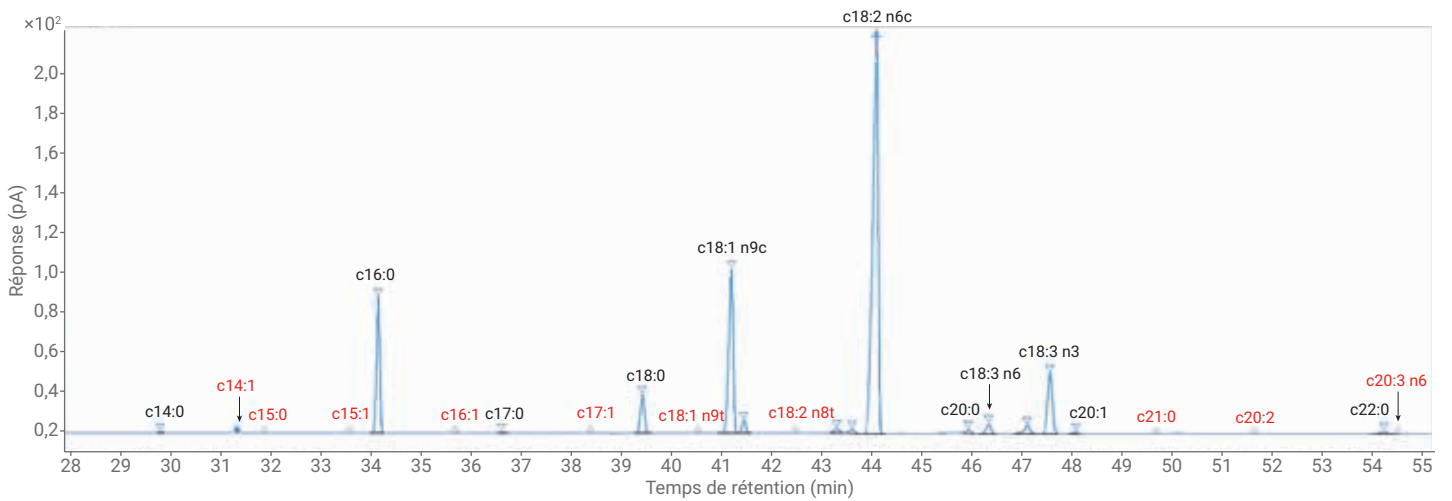


Figure 6B. Chromatogramme pour l'analyse de l'huile de soja.

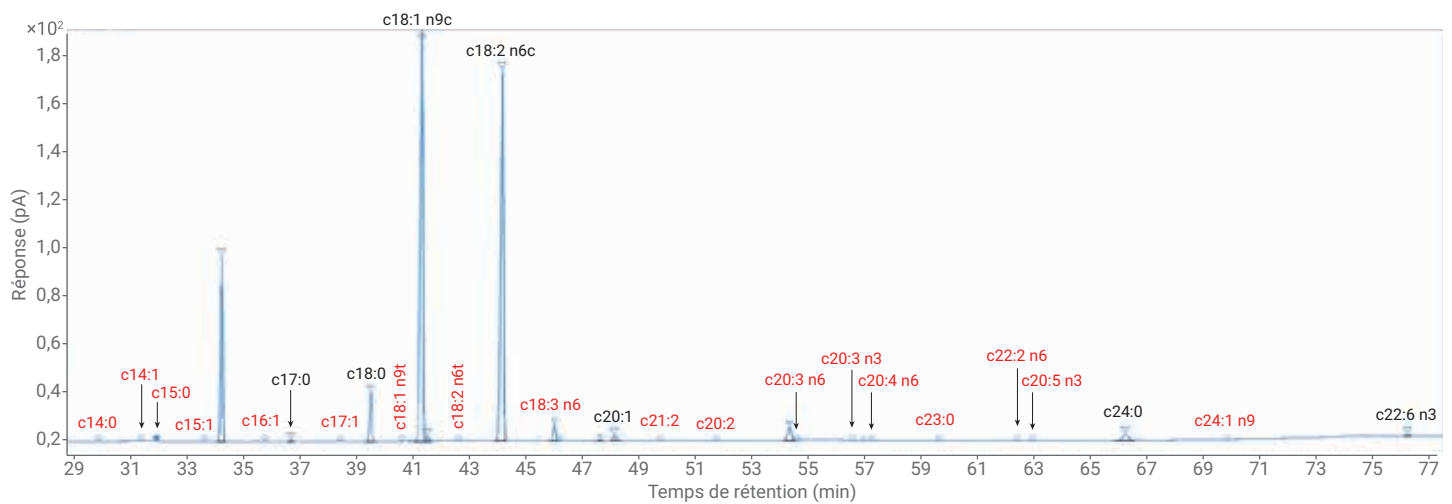


Figure 6C. Chromatogramme pour l'analyse de l'huile d'arachide.

Conclusions

L'utilisation d'un GC 8890A équipé d'une colonne HP-88 pour l'analyse de 37 FAME représentatifs et de 21 FAME *trans* a permis d'obtenir une bonne résolution avec les deux types d'échantillons. La résolution pour la paire de composés critiques a satisfait, et même dépassé, les exigences des méthodes GB 5009.168-2016 et GB 5009.257-2016. L'excellente reproductibilité des temps de rétention et des aires des pics, ainsi que la linéarité du FID sur une large plage de concentration, a prouvé que le GC 8890A est parfaitement adapté à la réalisation d'analyses fiables des FAME.

Références

1. Determination of fatty acids in food, GB5009.168-2016 method.
2. Determination of *trans* fatty acids in food, GB5009.257-2016 method.
3. A fast analysis of FAME by Intuvo 9000 GC, *Note d'application d'Agilent Technologies*, numéro de publication 5991-9482EN.

www.agilent.com/chem

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Imprimé aux États-Unis, le 2 janvier 2019
5994-0549FR