

Aurélie EUDE
CFI 4



Laboratoire de chimie analytique
Place Emile Blondel
76 131 Mont Saint Aignan cedex
www.insa-rouen.fr

Dosage des omégas 3 et 6 dans les suppléments alimentaires et les poissons gras

Projet d'étude
2005

Janvier à Mars

Remerciements

Avant de commencer la rédaction de ce rapport, je tiens à remercier Monsieur Stéphane MARCOTTE, responsable du laboratoire de chimie analytique de l'INSA de Rouen, pour m'avoir permis de réaliser ce projet d'étude, ainsi que pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Pascal MANDIN et Madame Fatima MATTIUZ, techniciens du laboratoire, pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide tout au long de ce projet d'étude.

Enfin, je remercie le personnel des laboratoires de chimie organique et polymères pour la mise à disposition de leur matériel et de leurs locaux.

Sommaire

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

PRESENTATION DU PROJET

PARTIE 1 : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1 - Les acides gras

- a) Structure
- b) Propriétés
- c) Nos besoins

2 - Préparation des échantillons

- a) Extraction des acides gras
- b) Transformation en esters méthyliques

3 - Quantification par chromatographie en phase gazeuse (GC)

Références bibliographiques

PARTIE 2 : METHODE D'ANALYSE

1 - Isolement des acides gras et transformation en esters méthyliques

- a) Extraction des lipides
- b) Transformations des acides gras en esters méthyliques

2 - Chromatographie en phase gazeuse (GC)

3 - Choix de l'étalon interne

4 - Détermination des conditions chromatographiques optimales

- a) Choix d'une colonne
- b) Choix des conditions de température
- c) Résumé des conditions chromatographiques choisies

Présentation du projet

Les matières grasses et plus précisément les acides gras qui les composent semblent être aujourd'hui le souci permanent des diététiciens et des personnes souffrant de maladies impliquant un régime alimentaire. Et alors que les médias ne cessent de nous bombarder d'annonces publicitaires vantant les mérites de tel ou tel produit pauvre en matière grasse ou aidant à la diminution du cholestérol, de nouveaux composés sont mis sur le devant de la scène : les $\omega 3$.

Cette famille d'acides gras, ainsi que celle moins connue des $\omega 6$ font l'objet de cette étude. En effet, compte tenu de leur importance pour le bon fonctionnement de notre organisme, il paraît intéressant de les quantifier dans divers aliments, notamment les poissons gras, et dans les compléments alimentaires dits « sources d'acides gras oméga 3 » ou « riches en acides gras oméga 3 ». Au final, les résultats pourront être comparés, permettant ainsi de discuter l'efficacité de ces compléments alimentaires.

L'objectif de ce projet est donc d'une part de déterminer une méthode permettant d'extraire efficacement les acides gras des aliments et compléments alimentaires considérés. Puis d'autre part, de définir une méthode de quantification des extraits obtenus.

Ainsi, ce rapport est divisé en trois parties. La première partie résume les recherches bibliographiques effectuées sur ce sujet, qui ont constituées le point de départ de cette étude. Ensuite, la deuxième partie expose les méthodes d'extraction et de quantification choisies, ainsi que leur validation. Pour finir, la troisième et dernière partie est consacrée aux analyses effectuées et aux commentaires sur les résultats obtenus.

Partie 1 : Recherche bibliographique

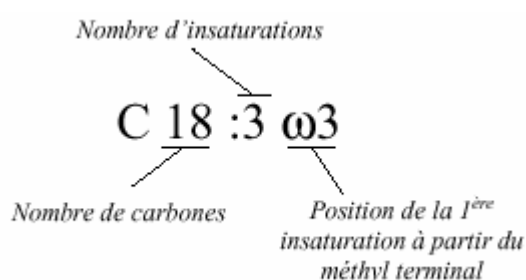


Partie 1 : Recherche bibliographique

I - Les acides gras Oméga 3 et Oméga 6

1) Nomenclature

Les constituants essentiels des lipides sont les acides gras. On distingue en général les acides gras saturés des acides gras insaturés. La différence entre ces 2 classes d'acides provient de l'existence d'une ou plusieurs doubles liaisons dans la structure chimique. Les acides gras sont en général nommés de façon simplifiée par une formule du type :

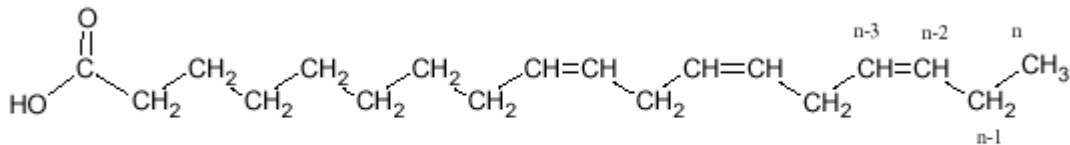


Ci-dessous, un tableau récapitulatif faisant le point sur les dénominations des acides gras les plus communs [1] :

Désignation simplifiée	Désignation commune	Désignation chimique
C 4:0	Acide butyrique	Acide butanoïque
C 6:0	Acide caproïque	Acide hexanoïque
C 8:0	Acide caprylique	Acide octanoïque
C 10:0	Acide caprique	Acide décanoïque
C 12:0	Acide laurique	Acide dodécanoïque
C 14:0	Acide myristique	Acide tétradécanoïque
C 16:0	Acide palmitique	Acide hexadécanoïque
C 16:0 iso	Acide iso palmitique	Acide 14-méthyl pentadécanoïque
C 16:1 ω 7c	Acide palmitoléique	Acide cis-9-hexadécénoïque
C 17:0	Acide margarique	Acide heptadécanoïque
C 18:0	Acide stéarique	Acide octadécanoïque
C 18:0 iso	Acide iso stéarique	Acide 16-méthyl heptadécanoïque
C 18:1 ω 9	Acide oléique	Acide 9-octadécénoïque
C 18:1 ω 9	Acide elaïdique	Acide trans-9-octadécénoïque
C 18:2 ω 6	Acide linoléique	Acide 9,12-octadécadiénoïque
C 18:3 ω 6	Acide gamma-linolénique	Acide 6,9,12-octadécatriénoïque
C 18:3 ω 3	Acide alpha-linolénique	Acide 9,12,15-octadécatriénoïque
C 20:0	Acide arachidique	Acide eicosanoïque
C 20:4 ω 6	Acide arachidonique	Acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque

Les ω 3 et ω 6 désignent la famille des acides gras insaturés en position 3 et 6.

Exemple de structure d'un acide gras :



Structure chimique de l'acide α -linoléique (C 18 :3 ω 3)

2) Propriétés

Les acides gras, plus connus sous le nom de matières grasses, sont indispensables dans un régime alimentaire équilibré. Ils permettent notamment à notre organisme de fabriquer les cellules et participent au bon fonctionnement du système nerveux. Ils sont également une source d'énergie privilégiée.

Plus particulièrement, les ω 3 et ω 6 contribuent à l'élaboration d'acides gras hautement insaturés et participent à une foule de processus importants [2] :

▪ Oméga 3 :

Les ω 3 jouent un rôle central au niveau des membranes cellulaires et interviennent dans de nombreux processus biochimiques de l'organisme : la régulation de la tension artérielle, l'élasticité des vaisseaux, les réactions immunitaires et anti-inflammatoires, l'agrégation des plaquettes sanguines...

Dans cette famille, seul l'acide alpha-linolénique (ALA) est dit « essentiel ». En effet, les autres acides gras ω 3 peuvent être fabriqués par le corps à partir de l'ALA. C'est notamment le cas de l'acide eicosapentanoïque (EPA) et de l'acide docosahexanoïque (DHA).

Les sources d' ω 3 se trouvent dans les aliments suivants :

- **origine végétale** : huile et graine de lin, huile et noix de Grenoble, graine et huile de chanvre, soja et huile de soja, huile de colza, huile de germes de blé, huile d'oreillette,...
- **origine animale** : poissons et huiles de poissons gras comme le thon, la sardine, le saumon, le flétan, le maquereau, le hareng, le pilchard. La graisse d'animaux, le beurre.

Attention : seuls les poissons gras sauvages sont riches en EPA et DHA. Les poissons d'élevage ont une composition en acides gras différente qui est le reflet de leur alimentation (utilisation d'huiles végétales et de farines animales...).

▪ Oméga 6 :

Les ω 6 jouent un rôle important au chapitre du système nerveux, de l'équilibre cardiovasculaire, de l'immunité, de la guérison des blessures et des réactions allergiques et inflammatoires.

Dans cette famille, seul l'acide linoléique (AL) est dit « essentiel ». En effet les autres acides gras ω 6 peuvent être fabriqués par le corps à partir de l'AL.

Contrairement aux $\omega 3$, les $\omega 6$ sont abondamment présents dans l'alimentation moderne :

- **origine végétale** : huile de pépins de raisin, de tournesol, de noix, de maïs, de bourrache, d'onagre, de carthame, de germe de blé, de soja, de sésame, de colza, d'arachide, de noisette, d'olive...
- **origine animale** : les œufs entiers, le beurre, l'huile de foie de morue, la graisse d'animaux.

3) Nos besoins

Un certain nombre de pays, ainsi que l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ont émis des recommandations au sujet de l'apport en $\omega 3$ [2]. Elles sont habituellement les suivantes :

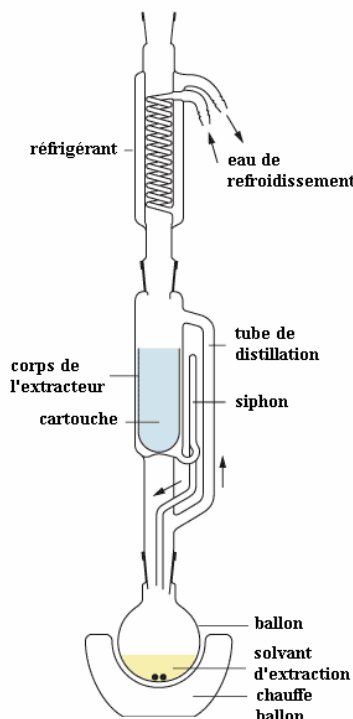
- ALA : de 0.8 à 1.1 g/jour
- EPA + DHA : de 0.3 à 0.5 g/jour

D'autre part, compte tenu de la complémentarité des $\omega 3$ et des $\omega 6$, il a également été établi que ces substances doivent être apportées dans des proportions précises : 1 $\omega 3$ pour 2 $\omega 6$.

Cependant, il est actuellement estimé que le rapport $\omega 6/\omega 3$ dans l'alimentation occidentale se situe entre 10 et 30 pour 1. Ce qui aggrave la situation, c'est que cet excès d' $\omega 6$ empêche l'utilisation optimale des $\omega 3$ par l'organisme, car ils se concurrencent. En effet, le métabolisme des $\omega 3$ et des $\omega 6$ fait appel aux mêmes enzymes et, dans une moindre mesure, à plusieurs vitamines (vitamine B3, B6, C et E) et minéraux (magnésium, zinc) communs. Un excès d' $\omega 6$ dans l'assiette empêche donc l'organisme d'exploiter adéquatement ses sources en $\omega 3$. Ce déséquilibre induit, entre autre chose, un état physiologique propice aux maladies cardiovasculaires ainsi qu'aux troubles allergiques et inflammatoires.

Selon plusieurs experts, un retour à une alimentation fournissant un ratio adéquat d' $\omega 6$ et d' $\omega 3$ aurait un impact positif sur la santé cardiovasculaire des populations occidentales, et réduirait aussi les maladies inflammatoires.

II - Préparation des échantillons



1) Extraction des acides gras

La première étape de la détermination des teneurs en acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$ dans les poissons gras et les suppléments alimentaires est l'extraction de ces substances de l'échantillon. Cette première étape ne concerne que les poissons puisque les compléments alimentaires se présentent déjà sous la forme d'huile de poisson, autrement dit d'acides gras.

Les différentes publications étudiées sur ce sujet [...-...] font pour la plupart référence à une même technique, à savoir une extraction au soxhlet avec un solvant apolaire.

L'extraction des acides gras par l'utilisation d'un soxhlet est l'une des méthodes les plus anciennes, mais aujourd'hui encore, c'est l'une des plus usuelles.

Les extracteurs de ce type, comme l'indique les *Techniques de l'Ingénieur* [...] permettent le traitement de solides de toute tailles, avec des solvants chauds en phase liquide.

Le fonctionnement de cet appareil est le suivant :

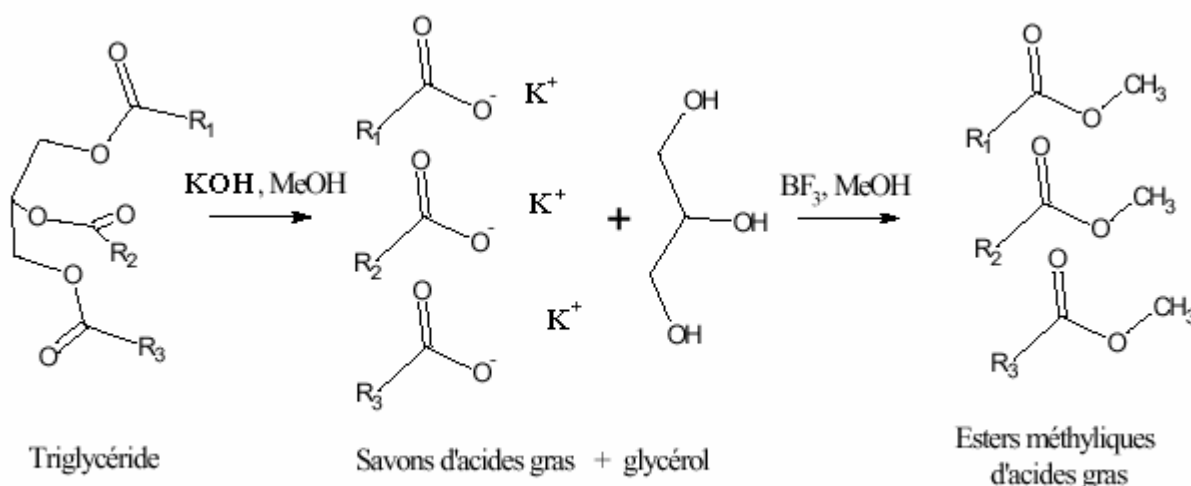
Le corps de l'extracteur, contenant une cartouche remplie de l'échantillon à analyser, est fixé à la partie supérieure et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé, et traverse le lit de solide par percolation pour donner une solution qui est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. La solution du ballon s'enrichit petit à petit en soluté et le solide est toujours mis en contact avec du solvant fraîchement distillé.

Concernant le solvant d'extraction, ces mêmes publications mentionnent deux mélanges différents, soit hexane-dichlorométhane (1:1 v/v), soit hexane-acétone (4:1 v/v).

2) Transformation en esters méthyliques

Avant d'être analysés, les acides gras doivent ensuite être transformés en esters méthyliques, par saponification puis par estérification.

Là encore, la littérature scientifique préconise, pour une large majorité, une seule et même méthode ; en ce qui concerne les réactifs utilisés tout du moins, car parfois le mode opératoire diffère quelque peu. En effet, les lipides sont tout d'abord saponifiés par l'action d'une solution d'hydroxyde de potassium dans du méthanol, puis estérifiés par une solution de BF_3 en excès de méthanol.



Réaction de saponification et méthylation des triglycérides

III - Quantification par chromatographie en phase gazeuse (GC)

Dans quelques publications scientifiques [...], la quantification des acides gras se fait par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Mais cette méthode ne représente qu'une minorité des travaux effectués sur ce sujet, et ne sera donc pas retenue.

D'autres articles [...], plus nombreux cette fois, mentionnent l'utilisation de la chromatographie de fluide supercritique (SFC). Cette technique, relativement récente, combine à les fois les avantages de l'HPLC et de la GC. Cependant c'est une méthode qui, aujourd'hui, est encore peu répandue. De plus c'est une technique qui ne peut pas être utilisée au laboratoire de chimie analytique de l'INSA puisque celui-ci ne dispose pas des appareils nécessaires. Par conséquent, cette méthode ne sera pas non plus retenue non plus.

La méthode la plus largement représentée dans les journaux scientifiques [...] est la chromatographie en phase gazeuse (GC).

H-J. de Geus, I. Aidos, J. de Boer, J. B. Luten et U. A. Th. Brinkman [...] utilisent pour leur part une analyse chromatographique multidimensionnelle, c'est-à-dire un couplage GCxGC. La première colonne est une colonne capillaire de silice fondue, plus particulièrement une 0.33 μm HP-1 (diméthylpolysiloxane) de dimension 9.0 m x 0.2 mm i.d. et la seconde, une 0.2 μm CP-WAX-52 (poly-éthylène glycol) de dimension 0.30 m x 0.1 mm i.d.. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Injection split (1:50), 1.0 μL , 270°C
- Détection FID, 300 °C
- Programme de température de la 1^{ère} colonne 100°C, 2 min ; 30°C/min jusqu'à 160°C
- Programme de température de la 2^{ème} colonne 180°C, 2 min ; 0.75°C/min jusqu'à 260°C

M. Jalali-Heravi et M. Vosough [...], quant à eux, quantifient les acides gras par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). La colonne utilisée est une colonne capillaire DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d.). Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Injection split (1:20), 260°C
- Programme de température de la colonne 130°C ; 5°C/min jusqu'à 260°C
- Spectromètre de masse énergie d'ionisation : 70eV

Références bibliographiques

A la fin !!

1. Naturosanté [en ligne]. Disponible sur : <<http://naturosanté.com>> (consulté le 24.03.05)
2. Rubinson, J.F.; Neyer-Hilvert, J. *Journal of Chemical Education*, **1997**, vol 74, pp.1106-1108
3. Bender, J. D.; Catino III, A. J.; Hess, K. R.; Lassman, M. E.; Leber, P. A.; Reinard, M. D., Strotman, N. A.; Pike, C. S. *Journal of Chemical Education*, **2000**, vol 77, pp.1466-1468
4. Schultz, E.; Pugh, M. E. *Journal of Chemical Education*, **2001**, vol 78, pp.944-946
5. Crowley, J. P.; DeBoise, K. L.; Marshall, M.R.; Shaffer, H. M.; Zafar, S.; Jones, K. A.; Palko, N. R.; Mitsch, S. M.; Sutton, L. A.; Chang, M.; Fromer, I.; Kraft, J.; Meister, J.; Shah, A.; Tan, P.; Whitchurch, J. *Journal of Chemical Education*, **2002**, vol 79, pp.824-827
6. Jalali-Heravi, M.; Vosough, M. *Journal of Chromatography A*, **2004**, vol 1024, pp.165-176
7. Suchan, P. et al., *Analytica chimica Acta*, **2004**, vol 520, pp.193-200
8. Mansour, M. P.; Sinclair, A. J. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **1993**, vol 2, pp.155-163

Partie 2 : Méthode d'analyse et validation



Partie 2 : Méthode d'analyse

I - Quantification des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (GC)

1) Appareillage

a) Injecteur

La colonne utilisée pour cette quantification est une colonne capillaire. En effet, celle-ci est largement préférée aux colonnes remplies en raison de sa plus grande efficacité. Cependant elle présente un inconvénient important : sa faible capacité. Par conséquent, l'injecteur utilisé doit être tel que la quantité d'échantillon injectée soit suffisamment faible pour éviter de saturer la colonne. L'injecteur correspondant à cette définition est donc un injecteur split/splitless.

Ce type d'injecteur permet de n'envoyer dans la colonne qu'une fraction de l'échantillon contenu dans la seringue. L'autre partie de l'échantillon est évacuée par la sortie 2, entraînée par la fraction de gaz vecteur qui ne passera pas, elle non plus, sur la colonne. La quantité d'échantillon envoyée dans la colonne peut être réglée en modifiant le taux de split, c'est-à-dire le débit de gaz vecteur qui s'échappe par la sortie 2, entraînant avec lui une partie de l'échantillon injecté.

b) Détecteur

La plupart des travaux scientifiques déjà réalisés sur ce sujet utilisent soit un couplage de 2 chromatographies en phase gazeuse (GCxGC), soit une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Mais en avant d'en arriver à ces 2 méthodes relativement complexe, on teste d'abord une méthode plus simple, la chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur FID (flame ionization detector) (GC-FID). Pour cela, on injecte un échantillon d'huile de poisson provenant des compléments alimentaires ayant subi le traitement détaillé précédemment. Il se trouve que les acides gras sont bien détectés par un tel système, qui est donc conservé pour la suite de cette étude.

Le principe de fonctionnement d'un détecteur FID est relativement simple. Comme on peut le remarquer sur le schéma, il est alimenté en air comprimé et hydrogène, permettant la formation et le maintien de la flamme. Les différents composés, après avoir traversés la colonne, arrivent au niveau de la flamme et entrent en combustion. Cela génère des ions qui sont ensuite captés par l'électrode. Celle-ci envoie alors un signal électrique et il suffit d'enregistrer les variations de ce signal pour obtenir le chromatogramme.

c) Chromatographe Varian 3400



Le chromatographe utilisé est un chromatographe de marque Varian, modèle 3400. Celui-ci est équipé d'un injecteur split/splitless et d'un détecteur FID. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium.

D'autre part, pour l'acquisition des chromatogrammes et de leur retraitement, il est couplé à un ordinateur équipé du logiciel Azur, version 4.0.

2) Détermination des conditions chromatographiques optimales

a) Choix d'une colonne

Une grande majorité des publications traitant des acides gras mentionnent l'utilisation de colonnes capillaires. D'autre part, le laboratoire dispose d'une colonne de ce type déjà montée sur le chromatographe et qui a été utilisée lors de la quantification des acides gras dans les huiles végétales.

Les caractéristiques de cette colonne sont les suivantes :

- Colonne capillaire RSL-500
- Diamètre interne : 0.25 mm
- Epaisseur du film : 0.25 μm
- Température maximale d'utilisation : 240°C

Cette colonne peut donc être tout à fait adaptée à la quantification des acides gras dans les huiles de poissons. Et c'est le cas puisque le chromatogramme correspondant à l'injection réalisée en vue du test du détecteur indique la présence des acides gras. Il reste maintenant à déterminer les conditions de températures optimales.

b) Choix des conditions de température

Les premiers essais ont tout d'abord été effectués en mode isotherme (50, 100, 150 puis 200°C), mais ceux-ci se sont avérés peu concluants. En effet, les chromatogrammes obtenus n'étaient pas de bonne qualité, en termes de résolution et d'asymétrie des pics.

Les essais qui ont suivi ont donc été réalisés dans le but de trouver le gradient de température optimal, permettant d'obtenir les pics les mieux résolus et les plus symétriques possibles, tout cela dans un temps d'analyse raisonnable.

Le meilleur chromatogramme a été obtenu pour le gradient suivant :

- 180°C pendant 0.5 min
- augmentation jusqu'à 240°C à raison de 5°C/min
- maintien à 240°C pendant 10min

Ce qui au total représente un temps d'analyse de 22.5 min.

c) Résumé des conditions chromatographiques choisies

Colonne	RSL-500 (polyphenylcyanopropylméthylsiloxane, 0.25 µm) 0.25 mm x 30 m
Gaz vecteur	Hélium, 0.5 mL/min (cm/s)
Taux de split	1:15
Température de l'injecteur	250°C
Température du détecteur	250°C
Programme de température de la colonne	180°C pendant 0.5 min, augmentation jusqu'à 240°C à un taux de 5°C/min puis maintien à 240°C pendant 10 min
Volume des injections	0.5 µL

3) Choix de l'étalon interne

La méthode de quantification la plus précise aujourd'hui est très certainement l'étalonnage interne. Cette technique consiste à ajouter un étalon interne à l'échantillon à analyser. Le choix de cet étalon doit se faire selon certaines conditions. Tout d'abord, il ne doit évidemment pas être présent dans l'échantillon, puisque l'étalon interne joue en quelque sorte le rôle de « référence ». De plus, celui-ci doit être choisi de telle sorte que sa structure chimique soit proche de celle des composés à quantifier, ici les acides gras, sous forme d'esters méthyliques.

Or, en injectant plusieurs des esters méthyliques disponibles au laboratoire, on a pu remarqué que l'un d'entre eux n'était pas présent dans le chromatogramme correspondant à l'analyse des compléments alimentaires, et donc susceptible d'être utilisé comme étalon interne. Il s'agit du méthyl béhénate (C22:0).

II - Isolement des acides gras et transformation en esters méthyliques

1) Extraction des lipides

Cette phase de l'analyse, comme cela l'a été précisé précédemment, est réalisée au moyen d'un soxhlet. D'autre part, elle ne concerne que les poissons gras, les compléments alimentaires étant déjà conditionnés sous la forme d'huile de poisson.

Cette méthode d'extraction s'est révélée relativement simple à utiliser :



- 10-g de poisson gras, préalablement mixé, sont pesés dans une cartouche d'extraction en cellulose. Cet échantillon est ensuite mélangé à 70-g de sulfate de sodium anhydre jusqu'à l'obtention d'une poudre.
 - La cartouche est fermée avec un morceau de coton et mise au dessiccateur pendant 12h. Cette étape a pour but de sécher l'échantillon, permettant une bonne pénétration du solvant lors de l'extraction.
 - Les acides gras sont extraits pendant 8h à l'aide d'un soxhlet (voir schéma ci-contre), à raison de 7 cycles/h. Le solvant d'extraction utilisé est un mélange hexane-dichlorométhane (1:1 v/v). Celui-ci est contenu dans un ballon de 250-mL, préalablement pesé.
- Une fois l'extraction terminée, le ballon contenant les acides gras extraits est récupéré et le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. La masse de graisse est alors déterminée

Soxhlet

gravimétriquement.

2) Transformation des acides gras en esters méthyliques

Avant analyse, les acides gras doivent être convertis en esters méthyliques par saponification puis par estérification des lipides :

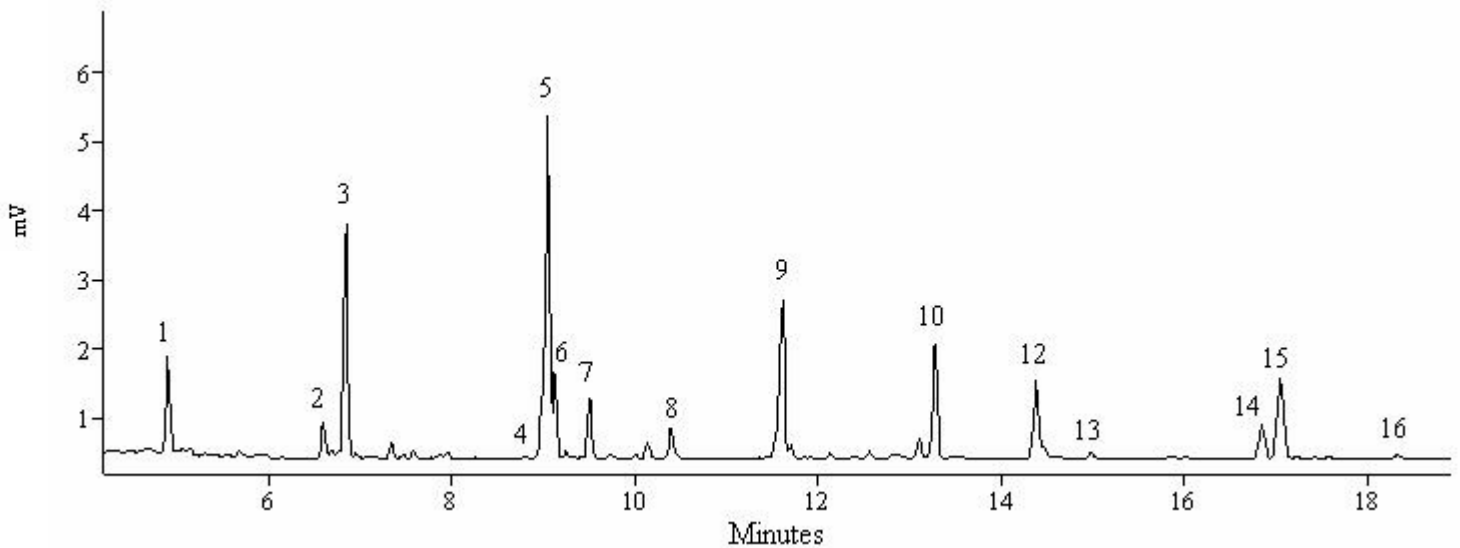
- 2-g d'échantillon sont pesés puis dissous dans un peu d'éther de pétrole (pour les poissons gras, la totalité des graisses obtenues après extraction sont directement dissoutes dans le ballon). Le mélange est transféré dans une fiole de 25 mL, ensuite complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'éther de pétrole.
- 0.5-mL de cette solution et 1.0-mL de méthyl béhénate (étalon interne) sont introduits dans un pilulier équipé d'un bouchon en téflon. Le solvant est évaporé sous un flux d'azote.
- Saponification : 2.0-mL de potasse méthanolique (KOH/MeOH, 58-mg/mL) sont introduits. L'air contenu dans le tube est alors remplacé par de l'azote. Le pilulier est rapidement refermé et placé dans un bain d'huile à 105°C pendant 10 min.
- Estérification : Après refroidissement à température ambiante, 4.0-mL de trifluorure de bore dans un excès de méthanol (BF₃/MeOH, 12% en masse) sont ajoutés. Le tube est ensuite remplacé dans le bain d'huile pendant 10 min.
- Les esters méthyliques sont extraits dans 10 mL d'éther de pétrole. La phase organique est alors lavée avec 2 mL d'eau distillée et séchée sur sulfate de sodium.
- Le mélange est filtré sur coton de verre dans une fiole de 10 mL, ensuite complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'éther de pétrole.

III - Identification des acides gras

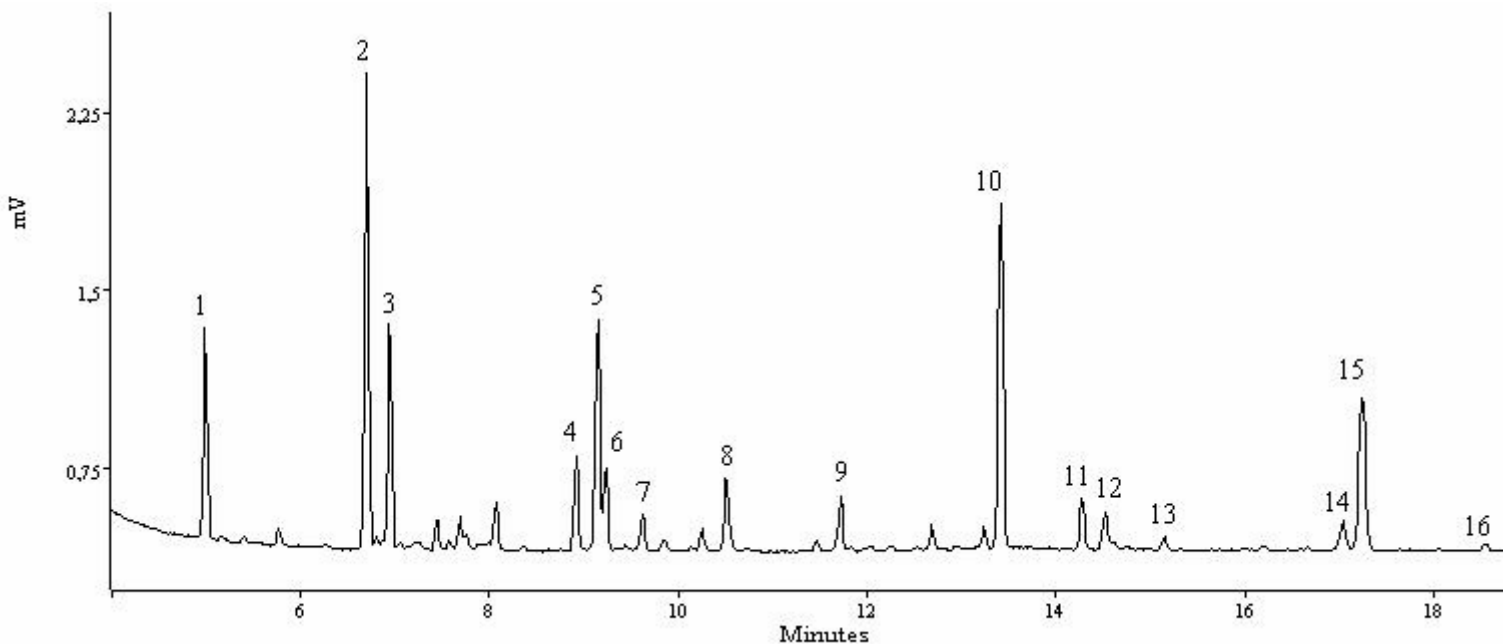
L'analyse des chromatogrammes obtenus est relativement complexe compte tenu de la quantité d'acides gras présents dans les échantillons. En effet, chaque échantillon analysé comporte en moyenne une quinzaine d'acide gras différents.

Ainsi, pour identifier avec certitude chacun des acides gras présents, nous avons comparé les temps de rétention des composés de l'échantillon avec ceux du mélange d'étalons PUFA No.1, Marine Source, acheté chez Supelco.

Ci-dessous les chromatogrammes utilisés pour la comparaison des temps de rétention, suivis de l'identification des pics :



Partie du chromatogramme du mélange d'étalons, PUFA No.1, Marine Source - Supelco



Partie du chromatogramme de l'huile de poisson XXXX - Laboratoires XXXX, après traitement

No.	Composés	Forme abrégée
1	Acide myristique	C14:0
2	Acide palmitique	C16:0
3	Acide palmitoléique	C16:1 ω 7c
4	Acide stéarique	C18:0
5	Acide oléique	C18:1 ω 9c
6	Acide vaccénique	C18:1 ω 7
7	Acide linoléique	C18:2ω6c
8	Acide stéaridonique	C18:4ω3
9	Acide cis-11-eicosénoïque	C20:1 ω 9
10	EPA (acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque)	C20:5ω3
11	Acide béhénique	C22:0
12	Acide 11-docosénoïque	C22:1 ω 11
13	Acide érucique	C22:1 ω 9
14	Acide 7,10,16,19-docosapentaénoïque	C22:5ω3
15	DHA (acide 4,7,10,13,16,19-docosaénoïque)	C22:6ω3
16	Acide nervonique	C24:1 ω 9

IV - Etalonnage

Pour pouvoir quantifier les acides gras dans les échantillons à analyser, il est nécessaire de faire au préalable des courbes d'étalonnage de ces différents composés. De plus, avant d'utiliser ces courbes, nous devons vérifier que ces dernières sont bien linéaires.

1) Gamme d'étalonnage

Pour préparer la gamme d'étalonnage la plus adaptée, nous devons d'abord avoir une idée des concentrations en acides gras attendue dans les différents échantillons. Cela étant difficile à réaliser, nous avons décidé d'utiliser une gamme d'étalonnage très large.

La gamme d'étalonnage suivante est donc préparée :

	Forme abrégée	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 6	Etalon 7	Etalon 8
Myristate	C14:0	20	50	100	200	500	700	900	1200
Palmitate	C16:0	20	50	100	200	500	700	900	1200
Stéarate	C18:0	20	50	100	200	500	700	900	1200
Oléate	C18:1 ω 9c	20	50	100	200	500	700	900	1200
Arachidate	C20:0	20	50	100	200	500	700	900	1200
DHA	C22:6 ω 3	100	200	500	700	1000	—	—	—

Remarques :

- Théoriquement, 5 points suffisent pour faire une courbe d'étalonnage. Mais le fait de préparer 8 étalons permet d'avoir une marge d'erreur : certains points aberrants pourront alors être supprimés.
- La concentration en étalon interne (acide béhénique) n'est pas indiquée car elle n'est pas constante dans tous les étalons. En effet, les premières courbes d'étalonnages ont été réalisées avec les étalons déjà présents au laboratoire. Mais ensuite d'autres étalons (DHA et arachidate) ont ensuite été commandés.

2) Droites d'étalonnage

Les étalons sont injectés dans les conditions chromatographiques précisées précédemment. On obtient des droites d'étalonnage du type : $A_A/A_{EI} = f(C_A/C_{EI})$

A_A : Aire du pic de l'acide gras

A_{EI} : aire du pic de l'étalon interne

C_A : concentration en acide gras

C_{EI} : concentration en étalon interne.

Les équations des droites d'étalonnages obtenues sont les suivantes (cf. courbes d'étalonnage en Annexe ...) :

- Acide myristique (C14:0) : $A_M/A_{EI} = 1.0388 C_M/C_{EI} + 0.0369$
 $R^2 = 0.9986$
- Acide palmitique (C16:0) : $A_P/A_{EI} = 1.0273 C_P/C_{EI} - 0.0086$
 $R^2 = 0.9996$
- Acide stéarique (C18:0) : $A_S/A_{EI} = 0.9624 C_S/C_{EI} - 0.045$
 $R^2 = 0.9997$
- Acide oléique (C18:1 ω 9c) : $A_O/A_{EI} = 0.986 C_O/C_{EI} - 0.0675$
 $R^2 = 0.9996$
- Acide linoléique (C18:2 ω 6c) : $A_L/A_{EI} = 0.9534 C_L/C_{EI} - 0.0497$
 $R^2 = 0.9997$
- Acide arachidique (C20:0) : $A_A/A_{EI} = 1.0092 C_A/C_{EI} + 0.1152$
 $R^2 = 0.9969$
- DHA (C22:6 ω 3) : $A_{DHA}/A_{EI} = 0.6187 C_{DHA}/C_{EI} + 0.0831$
 $R^2 = 0.9976$

Les coefficients de corrélations obtenus sont dans l'ensemble très satisfaisants. Les courbes d'étalonnage sont donc bien des droites.

Partie 3 : Validation de la méthode



Partie 3 : Validation de la méthode

La validation complète d'une méthode repose sur un très grand nombre de paramètres ; paramètres bien trop nombreux pour être étudiés pendant ce projet. Cependant cet aspect est très important en chimie analytique. Par conséquent, nous validerons en partie la méthode utilisée, plus précisément la méthode chromatographique et le protocole expérimental.

I – Validation de la méthode chromatographique

Différents paramètres permettent d'étudier la qualité d'une colonne : l'asymétrie et la résolution des pics, le nombre de plateaux théoriques, la répétabilité des temps de rétention, les limites de détection et de quantification.

1) Asymétrie des pics

Théoriquement, un pic correspond à une distribution symétrique Gaussienne. Une séparation insuffisante produit une déviation par rapport à cette forme idéale.

L'asymétrie, paramètre sans unité, est déterminée de la façon suivante selon la Pharmacopée US / Européenne :

$$A_s = (L_{G5} + L_{D5}) / (2 \times L_{G5})$$

L_{G5} = Largeur gauche à 5% de la hauteur

L_{D5} = Largeur droite à 5% de la hauteur

Cette asymétrie, pour être considérée comme acceptable, doit être inférieure à 1.50 [...].

Sur 5 injections d'huile de poisson XXXX, des laboratoires XXXX(cf. chromatogrammes en Annexe 1), on obtient les résultats suivants :

	Huile de poisson 1	Huile de poisson 2	Huile de poisson 3	Huile de poisson 4	Huile de poisson 5
Acide myristique	1.20	1.12	0.95	1.12	1.13
Acide palmitique	1.01	0.93	0.93	1.20	0.91
Acide palmitoléique	0.89	1.14	1.15	1.09	1.14
Acide stéarique	0.93	0.91	0.92	0.97	1.03
Acide oléique	—	—	—	—	—
Acide vaccénique	—	—	—	—	—
Acide linoléique	—	0.83	0.88	0.91	1.00
Acide stéaridonique	1.07	1.13	1.16	1.36	1.45
Acide cis-11-eicosénoïque	0.82	0.88	0.75	/	0.82
EPA	0.88	0.98	0.88	1.02	0.90
Acide 11-docosénoïque	0.90	0.86	1.04	0.94	1.13
Acide erucique	—	—	—	—	—
Acide 7,10,16,19-docosapentaénoïque	1.09	0.93	1.02	0.92	0.89
DHA	0.91	1.04	0.92	1.02	1.05
Acide nervonique	0.89	0.88	—	1.04	—

Ce tableau montre donc que la plupart des asymétries sont respectées. En effet, seuls quels composés ont une asymétrie systématiquement égale à 0. C'est notamment le cas de l'acide oléique et

de l'acide vaccénique (pics 5 et 6), qui sont des pics co-élusés, et de l'acide érucique (pic 13), pic très petit.

Cependant les pics correspondant aux acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$, composés qui nous intéressent tout particulièrement, ont une asymétrie inférieure à 1.50. La norme est donc respectée pour ces composés.

2) Résolution des pics

La résolution est un paramètre qui définit si 2 pics sont bien séparés.

La Pharmacopée Européenne préconise la formule suivante :

$$R = 1.18 \times (t_{Rn} - t_{Rn-1}) / (L_{50n} + L_{50n-1})$$

t_{Rn} = temps de rétention du pic

t_{Rn-1} = temps de rétention du pic précédent

L_{50n} = Largeur à 50% du pic

L_{50n-1} = Largeur à 50% du pic précédent

La résolution des pics doit être supérieure ou égale à 1.20 [...].

Sur les 5 mêmes injections d'huile de poisson XXXXX, des laboratoires XXXX, on obtient les résultats suivants :

	Huile de poisson 1	Huile de poisson 2	Huile de poisson 3	Huile de poisson 4	Huile de poisson 5
Acide myristique	9.23	9.47	9.20	9.35	9.28
Acide palmitique	20.61	19.16	19.21	19.90	21.05
Acide palmitoléique	3.11	2.75	2.77	2.98	2.88
Acide stéarique	24.60	23.52	23.95	23.97	24.25
Acide oléique	2.63	2.57	2.60	2.82	2.78
Acide vaccénique	0.96	0.95	0.95	0.73	0.98
Acide linoléique	4.49	4.53	4.56	4.44	4.53
Acide stéaridonique	9.89	10.11	10.25	10.30	10.07
Acide cis-11-eicosénoïque	13.89	13.90	13.99	13.68	14.17
EPA	18.93	18.75	17.97	18.20	19.28
Acide 11-docosénoïque	8.97	8.82	8.72	9.09	8.72
Acide erucique	2.33	2.30	2.51	2.46	2.60
Acide 7,10,16,19-docosapentaénoïque	5.83	5.74	5.68	5.51	6.11
DHA	1.69	1.55	1.67	1.55	1.55
Acide nervonique	9.77	10.33	9.81	9.22	9.92

Les résolutions calculées sont donc bien supérieures à 1.20. Excepté pour l'acide vaccénique, dont la résolution est comprise entre 0.73 et 0.98. Cette valeur s'explique par le fait que les pics d'acide oléique et d'acide vaccénique sont co-élusés.

3) Répétabilité des temps de rétention

Afin de vérifier que les temps de rétention des différents acides gras sont répétables, on calcule les coefficients de variation de ces derniers. Les valeurs obtenues doivent être inférieures à **20%**.

Les moyennes des temps de rétention sont effectuées sur les 5 mêmes échantillons qui ont servi à vérifier l'asymétrie et la résolution des pics.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	Forme abrégée	Moyenne t_R	Ecart type	CV (%)
Acide myristique	C14:0	4,94	0,033615473	0,68
Acide palmitique	C16:0	6,65	0,039623226	0,60
Acide palmitoléique	C16:1 ω 7c	6,89	0,037815341	0,55
Acide stéarique	C18:0	8,87	0,043243497	0,49
Acide oléique	C18:1 ω 9c	9,09	0,051185936	0,56
Acide vaccénique	C18:1 ω 7	9,17	0,046368092	0,51
Acide linoléique	C18:2ω6c	9,57	0,043243497	0,45
Acide stéaridonique	C18:4ω3	10,45	0,041231056	0,39
Acide cis-11-eicosénoïque	C20:1 ω 9	11,66	0,051185936	0,44
EPA	C20:5ω3	13,35	0,057271284	0,43
Acide béhénique	C22:0	14,20	0,057271284	0,40
Acide 11-docosénoïque	C22:1 ω 11	14,45	0,063796552	0,44
Acide erucique	C22:1 ω 9	15,07	0,069785385	0,46
Acide 7,10,16,19-docosapentaénoïque	C22:5ω3	16,93	0,082643814	0,49
DHA	C22:6ω3	17,14	0,076615925	0,45
Acide nervonique	C24:1 ω 9	18,43	0,084380092	0,46

Les résultats montrent donc que les temps de rétention sont parfaitement répétables, tous les coefficients de variation étant inférieurs à 1%.

4) Plateaux théoriques

Le nombre de plateaux théoriques est calculés à partir de la largeur du pic et de son temps de rétention. Sa détermination, selon la Pharmacopée Européenne, est la suivante :

$$PL = 5.54 \times (t_R/L_{50})^2$$

t_R : temps de rétention du pic

L_{50} : largeur du pic à mi-hauteur

Le nombre de plateaux théoriques doit être supérieur à 3000 pour qu'une colonne ait une bonne capacité de séparation des pics.

Le nombre de plateaux théoriques est calculé pour les 5 échantillons d'huile de poisson (cf. chromatogrammes an Annexe 1). Les résultats sont les suivants :

	Huile de poisson 1	Huile de poisson 2	Huile de poisson 3	Huile de poisson 4	Huile de poisson 5
Acide myristique	53521,50	45220,25	45171,28	51360,83	59547,70
Acide palmitique	107131,13	95853,35	99534,51	101717,97	107209,63
Acide palmitoléique	116078,81	104063,77	106588,21	106296,69	117633,11
Acide stéarique	194970,65	176233,87	188349,51	192930,50	184047,66
Acide oléique	179395,99	182692,47	181013,32	185966,89	184993,96
Acide vaccénique	168593,49	163607,14	166714,77	143324,13	184515,80
Acide linoléique	179983,44	193690,77	197101,98	212313,96	211547,39
Acide stéaridonique	216868,14	221041,67	233131,60	224105,71	207156,52
Acide cis-11-eicosénoïque	305925,96	302491,87	282594,89	271475,06	343746,27

PARTIE 3 : VALIDATION DE LA METHODE

EPA	316666,82	309980,53	285005,86	313220,85	306738,54
Acide 11-docosénoïque	297134,88	321297,20	306539,47	286900,87	381513,37
Acide erucique	316258,48	278868,46	282961,04	270784,85	283898,71
Acide 7,10,16,19-docosapentaénoïque	262941,55	263279,78	277331,04	262944,15	287336,41
DHA	295611,35	291653,35	271816,90	294747,60	275666,89
Acide nervonique	282062,85	359667,11	318412,68	225159,78	318374,80

Le nombre de plateaux théoriques est très largement supérieur à 3000, pour tous les acides gras identifiés.

5) Limite de détection (LD)

La limite de détection est définie comme étant la concentration de la solution injectée donnant une hauteur de pic égale à 2 fois la hauteur du bruit de fond. Le bruit de fond étant mesuré au pied du pic considéré.

Dans notre cas, il est impossible de mesurer la limite de détection de chaque acide gras, étant donné que nous ne disposons pas de tous ces composés sous forme d'étalon individuel. Nous considérerons donc que la limite de détection de tous les composés est égale à celle du composé ayant le facteur de réponse le plus faible.

Théoriquement, vu les courbes d'étalonnages, ce composé devrait être le DHA. Mais compte tenu de la faible quantité de DHA dont nous disposons et de son prix relativement élevé, cette limite de détection a été calculée avec l'acide linoléique.

La limite de détection de l'acide linoléique, et donc de tous les acides gras, a été évaluée à 2ppm (cf. chromatogramme 1 en Annexe 2).

6) Limite de quantification (LQ)

Un pic peut être quantifié dès lors que sa hauteur est 10 fois supérieure à celle du bruit de fond.

Là encore, nous ne sommes pas en mesure de déterminer la limite de quantification de chaque acide gras, pour les mêmes raisons que précédemment.

Celle-ci sera donc également calculée avec l'acide linoléique.

La limite de quantification de l'acide linoléique, et donc de tous les acides gras, est égale 20ppm (cf. chromatogramme 2 en Annexe 2).

II – Validation du protocole expérimental

1) Répétabilité de l'extraction des acides gras

Afin de vérifier la répétabilité de ce mode opératoire, on réalise 5 fois ce protocole sur un même échantillon, ici, sur un maquereau pêché en Norvège et acheté dans un supermarché local.

On analyse ensuite les solutions obtenues en GC, selon les conditions définies précédemment. Puis, on intègre les chromatogrammes obtenus et on vérifie la répétabilité des rapports d'aires A_{EM}/A_{EI} en calculant les coefficients de variation.

Pour qu'un mode opératoire soit considéré comme répétable, les coefficients de variation des rapports d'aires doivent être inférieurs à 20%.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	Forme abrégée	Moyenne A/A_{EI}	Ecart type	CV (%)
Acide myristique	C14:0	1,048014077	0,194515077	18,56034965
Acide palmitique	C16:0	4,341779789	0,579621113	13,34985054
Acide palmitoléique	C16:1 ω 7c	1,121455505	0,157671023	14,05949874

PARTIE 3 : VALIDATION DE LA METHODE

Acide stéarique	C18:0	1,145286576	0,129396179	11,29814855
Acide oléique	C18:1 ω 9c	3,50852187	0,252571826	7,198810088
Acide vaccénique	C18:1 ω 7	0,924798894	0,107287541	11,60117537
Acide linoléique	C18:2ω6c	0,242320261	0,046235478	19,08031882
Acide stéaridonique	C18:4ω3	0,464077426	0,058470551	12,59930942
Acide cis-11-eicosénoïque	C20:1 ω 9	0,737845651	0,09820279	13,30939467
EPA	C20:5ω3	1,122637004	0,076426252	6,807743875
Acide 11-docosénoïque	C22:1 ω 11	1,088499246	0,083248039	7,647964744
Acide erucique	C22:1 ω 9	—	—	—
Acide 7,10,16,19-docosapentaénoïque	C22:5ω3	0,298793363	0,034342139	11,49360846
DHA	C22:6ω3	1,516088487	0,019986103	1,318267565
Acide nervonique	C24:1 ω 9	0,2	—	—

(cf. chromatogrammes en Annexe 3)

Remarque : Les moyennes des aires ne sont calculées que pour 3 échantillons, les 2 autres extractions n'ayant pas fonctionné (évaporation du solvant, probablement par les joints du montage).

Les résultats obtenus sont donc relativement satisfaisants, tous les coefficients de variation étant inférieurs à la valeur plafond fixée à 20%. Plus précisément, les coefficients de variation correspondant aux acides gras qui nous intéressent dans cette étude, à savoir les ω 6 (surlignés en rouge) et les ω 3 (surlignés en orange) sont tout à fait acceptables. Ceux-ci sont en effet compris entre 1.3 et 19.1%.

2) Répétabilité de la transformation en esters méthyliques

Afin de vérifier la répétabilité de ce mode opératoire, on réalise 5 fois ce protocole sur un même échantillon, ici, sur l'huile de poisson XXXX des Laboratoires XXXXX, achetée en Pharmacie.

On analyse ensuite les solutions obtenues en GC, selon les conditions définies précédemment. Puis, on intègre les chromatogrammes obtenus et on vérifie la répétabilité des rapports d'aires A_{EM}/A_{EI} en calculant les coefficients de variation.

Pour qu'un mode opératoire soit considéré comme répétable, les coefficients de variation des rapports d'aires doivent être inférieurs à 20%.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la méthode de l'étalon interne. Dans ce cas, l'étalon, soit le méthyl béhénate, est ajouté juste avant l'analyse, soit après la transformation des lipides en esters méthyliques. Les rapports d'aires alors obtenus ne sont pas du tout répétables, les coefficients de variation atteignant 50% !!

Afin de résoudre ce problème, nous avons utilisé la méthode dite d'étalon de recouvrement. Cette fois-ci, le méthyl béhénate est ajouté avant le traitement des acides gras.

Contrairement à la méthode de l'étalon interne, la méthode de l'étalon de recouvrement ne dépend pas des rendements d'extraction (pourvu que ceux-ci soit égaux à celui du méthyl béhénate).

En effet, la méthode de l'étalon interne nous donne la relation suivante :

$$AM / AEI = K \times m^M / mEI$$

$$\text{Or, } m^M = Rdt \times mM$$

$$\text{D'où } AM / AEI = K \times Rdt \times mM / mEI$$

Par conséquent le rapport d'air dépend du rendement d'extraction des acides gras. La non répétabilité du protocole expérimental provient très probablement de cela. En effet, si les rendements d'extraction ne sont pas constants, les rapports d'air ne le sont donc pas non plus.

Ce n'est pas le cas pour la méthode de l'étalon de recouvrement. En effet, dans cette méthode, l'étalon interne subit lui aussi le traitement, d'où :

$$m^EI = Rdt \times mEI$$

$$\text{Et, } AM / AEI = K \times m^M / m^EI$$

$$\text{Soit } AM / AEI = K \times Rdt / Rdt \times mM / mEI$$

Cette relation est donc indépendante des rendements d'extraction. Cette méthode permet donc de corriger les variations possibles des rendements d'extraction.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

	Forme abrégée	Moyenne A/A _{EI}	Ecart type	CV (%)
Acide myristique	C14:0	3,341441711	0,17960106	5,374957149
Acide palmitique	C16:0	7,73570948	0,433612215	5,605332211
Acide palmitoléique	C16:1 ω 7c	3,608321853	0,214513625	5,944969263
Acide stéarique	C18:0	1,518462554	0,053655256	3,53352513
Acide oléique	C18:1 ω 9c	3,861337233	0,161226194	4,175397901
Acide vaccénique	C18:1 ω 7	1,377851432	0,094041048	6,825195062
Acide linoléique	C18:2ω6c	0,609398777	0,04336022	7,115245732
Acide stéaridonique	C18:4ω3	1,363566565	0,097687259	7,164099039
Acide cis-11-eicosénoïque	C20:1 ω 9	0,905698763	0,082485527	9,107390941
EPA	C20:5ω3	6,288584034	0,455356904	7,241008499
Acide 11-docosénoïque	C22:1 ω 11	0,729780392	0,066910666	9,168602944
Acide erucique	C22:1 ω 9	0,258292539	0,033682758	13,04054638
Acide 7,10,16,19-docosapentaénoïque	C22:5ω3	0,718042281	0,05890186	8,20311863
DHA	C22:6ω3	3,811109763	0,30087658	7,894723547
Acide nervonique	C24:1 ω 9	0,187833571	0,047792221	25,44391856

(cf. chromatogrammes en Annexe 1)

On remarque donc que dans l'ensemble, les coefficients de variation obtenus sont satisfaisants. Excepté pour l'acide 15-tétracosénoïque pour lequel celui-ci est égal à 25.4%. Cependant, les composés qui nous intéressent tout particulièrement dans cette étude sont les ω 6 (surlignés en rouge) et les ω 3 (surlignés en orange). Les coefficients de variation obtenus pour ces acides gras sont tout à fait acceptables puisque compris entre 7.5 et 8.5%.