

Analyse des acides gras libres

Les acides gras libres sont difficiles à analyser par chromatographie en phase gazeuse du fait de leur faible volatilité et de leur tendance à s'adsorber. Ainsi les acides gras sont-ils souvent analysés sous la forme d'esters méthyliques. Toutefois, la dérivation rallonge l'étape de préparation de l'échantillon et donc son coût. Elle peut également introduire une incertitude due à une perte éventuelle d'échantillon ou à une méthylation incomplète. Pour ces raisons, de nombreux laboratoires préfèrent analyser les acides gras sous leur forme libre.

Préparation des acides gras libres

Il est possible d'analyser directement les acides gras libres dans leur matrice ou de les préparer par saponification des glycérides. Différentes méthodes sont décrites dans les protocoles 971.11D et 923.09D de l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Les échantillons sont extraits avec un solvant et saponifiés par chauffage sous reflux avec un excédent d'alcali éthanolique aqueux dilué. Après saponification, l'échantillon est neutralisé à l'acide chlorhydrique ou sulfurique dilués. Très souvent, une solution aqueuse d'acide phosphotungstique est ajoutée après agitation ou mélange. L'échantillon peut être centrifugé et/ou filtré et est finalement dilué dans une solution aqueuse.

Injection des acides gras libres

Les acides gras libres les moins volatils peuvent être difficiles à analyser par injection « Split/Splitless » du fait de la discrimination propre aux composés à haut point d'ébullition. Pour minimiser la perte d'échantillon due à cette discrimination, il est conseillé d'utiliser l'injection directe. Il convient de ne pas con-

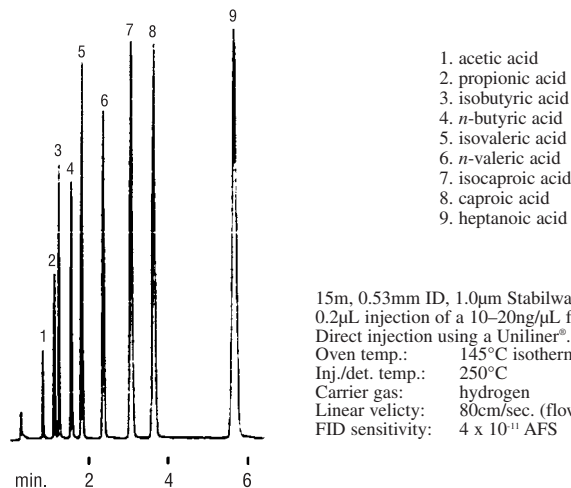
fondre injection directe et injection « On-column ». En mode injection directe, l'aiguille de la seringue dépose l'échantillon dans un insert d'injection, la colonne s'arrêtant à la base de cet insert. En mode « On-column », l'aiguille entre effectivement dans la colonne. Par rapport à l'injection « Split/Splitless », l'injection directe réduit également le risque de perte des acides gras libres les plus volatils, améliorant ainsi la reproductibilité des analyses quantitatives. Etant donné le risque d'adsorption lié aux acides gras libres, il est très important de s'assurer de l'inertie de l'ensemble du circuit de l'échantillon. Ainsi, l'insert d'injection doit-il être parfaitement désactivé et la colonne d'une grande inertie. Il est fortement recommandé d'assurer un entretien préventif régulier (nettoyage, remplacement) de l'insert d'injection afin d'en préserver l'inertie.

Choix d'une colonne

La colonne capillaire la plus couramment utilisée pour l'analyse des acides gras libres est la colonne Stabilwax®-DA. La phase stationnaire de la colonne Stabilwax®-DA est du Carbowax® greffé, spécialement désactivé pour l'analyse des composés acides. La Figure 1 montre l'analyse d'acides gras de C2 à C7 avec une colonne Stabilwax®-DA de 15 mètres, 0,53 mm de diamètre interne et un film de 1 µm. Grâce à la forte affinité des acides gras libres pour cette colonne, une excellente séparation peut être obtenue avec une colonne relativement courte de 15 mètres. Une colonne d'un diamètre de 0,53 mm permet de plus de réduire le temps d'analyse à 6 minutes. Un procédé de désactivation unique confère à la colonne Stabilwax®-DA une excellente inertie. Cette inertie permet d'obtenir des pics très fins et symétriques.

Figure 1

La sélectivité et l'inertie de la colonne Stabilwax®-DA permettent une analyse rapide des acides gras libres sous forme de pics fins et symétriques.



Séparation des acides libres saturés et insaturés

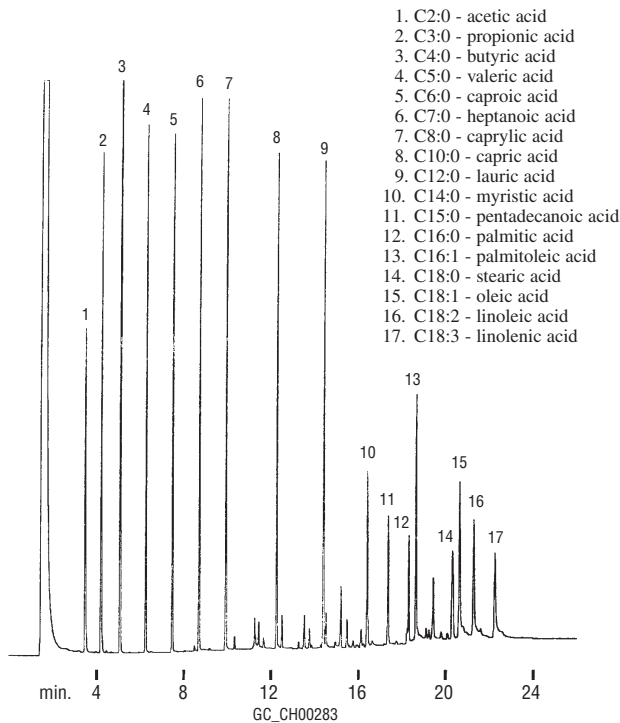
La grande stabilité thermique de la colonne Stabilwax®-DA (250°C) permet l'analyse des acides libres les moins volatils. La sélectivité de la colonne Stabilwax®-DA permet la séparation des acides libres essentiellement en fonction de leur longueur de chaîne et degré de saturation. La Figure 2 montre l'analyse d'acides libres saturés et insaturés avec une colonne Stabilwax®-DA (longueur 30 mètres, DI 0,53 mm, film de 0,25 µm). L'acide palmitique (C16:0) et l'acide palmitoléique (C16:1) sont bien séparés ainsi que l'acide stéarique (C18:0) et l'acide oléique (C18:1). Il en est de même pour l'acide linoléique (C18:2) et linoléénique (C18:3).

Analyse des acides gras libres avec une colonne apolaire

Une colonne apolaire à film épais comme la Rtx®-1 constitue une bonne alternative à la colonne Stabilwax®-DA pour l'analyse des acides gras libres volatils. Un film épais est nécessaire pour augmenter la capacité d'échantillon et la rétention des acides gras, ceux-ci n'ayant qu'une faible affinité avec les phases apolaires. La Figure 3 montre l'analyse d'acides gras libres C2 à C7 en moins de 8 minutes avec une colonne Rtx®-1 (longueur 30 mètres, DI 0,53 mm, film de 5 µm).

Figure 2

Les acides gras libres saturés et insaturés peuvent être facilement séparés avec une colonne Stabilwax®-DA.



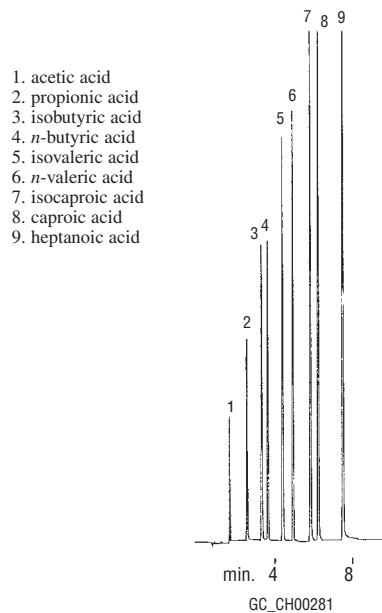
30m, 0,53mm ID, 0,25µm Stabilwax®-DA (cat.# 11025)
0,5µL direct injection of a 5mg/mL standard.

Oven temp.: 100°C (hold 2 min.) to 250°C @ 8°C/min.
Inj. & det. temp.: 280°C
Carrier gas: helium
Linear velocity: 40cm/sec. (flow rate: 5.2cc/min.)
FID sensitivity: 8 x 10⁻¹¹ AFS

1. C2:0 - acetic acid
2. C3:0 - propionic acid
3. C4:0 - butyric acid
4. C5:0 - valeric acid
5. C6:0 - caproic acid
6. C7:0 - heptanoic acid
7. C8:0 - caprylic acid
8. C10:0 - capric acid
9. C12:0 - lauric acid
10. C14:0 - myristic acid
11. C15:0 - pentadecanoic acid
12. C16:0 - palmitic acid
13. C16:1 - palmitoleic acid
14. C18:0 - stearic acid
15. C18:1 - oleic acid
16. C18:2 - linoleic acid
17. C18:3 - linolenic acid

Figure 3

Analyse d'acides gras libres à bas poids moléculaire avec la colonne Rtx®-1



1. acetic acid
2. propionic acid
3. isobutyric acid
4. n-butyric acid
5. isovaleric acid
6. n-valeric acid
7. isocaproic acid
8. caproic acid
9. heptanoic acid

30m, 0,53mm ID, 5,0µm Rtx®-1 (cat.# 10179)
0,2µL injection of a 10–20ng/µL free fatty acid standard in water.
Direct injection using a Uniliner® liner.

Oven temp.: 60°C to 180°C @ 15°C/min.
Inj. & det. temp.: 250°C
Carrier gas: hydrogen
Linear velocity: 50cm/sec. (flow rate: 6cc/min.)
FID sensitivity: 4 x 10⁻¹¹ AFS

En résumé, la méthylation des acides gras en vue de leur analyse par GC n'est pas toujours indispensable. Les acides gras peuvent être analysés sous leur forme libre de différentes façons. La colonne polaire Stabilwax®-DA constitue le meilleur choix pour l'analyse des acides gras libres de C2 à C20. L'excellente inertie de la colonne garantit des pics fins et symétriques. Sa sélectivité permet de séparer les acides gras saturés et insaturés de longueur de chaîne identique. Une autre méthode d'analyse consiste à choisir une colonne apolaire telle la Rtx®-1 avec cependant un film de phase épais. Ce type de colonne réalise rapidement une bonne séparation d'une série homologue d'acides gras volatils.

Colonne Rtx®-1*

Longueur	Diamètre interne	Épaisseur de phase	Référence
30 m	0,53 mm	5 µm	10179

Colonnes Stabilwax®-DA*

Longueur	Diamètre interne	Épaisseur de phase	Référence
15 m	0,53 mm	1 µm	11052
30 m	0,53 mm	0,25 µm	11025

*Ces colonnes sont disponibles dans d'autres configurations. Nous consulter.



© Copyright 2003, Restek Corporation

USA: 110 Benner Circle, Bellefonte, PA 16823 • phone: (800) 356-1688 or (814) 353-1300 • fax: (814) 353-1309
www.restekcorp.com

France: phone: 01 60 78 32 10 • fax: 01 60 78 70 90 • email: restekfr@club-internet.fr

Germany: phone: (49) 06172 2797 0 • fax: (49) 06172 2797 77 • email: RESTEK-GMBH@t-online.de

Thames Restek UK Ltd.: phone: 01494 563377 • fax: 01494 564990 • email: Sales@Thamesrestek.co.uk

Restek Ireland: phone: (44) 28 9081 4576 • fax: (44) 28 9081 4576 • email: restekurope@aol.com