

CHROM. 8296

DOSAGE DE GLYCÉRIDES PAR DENSITOMÉTRIE

J.-P. WATHELET

Chaire de Chimie Générale et Organique, Faculté des Sciences Agronomiques de l'État, Gembloux (Belgique)

J.-J. CLAUSTRIAUX

Chaire de Statistique, Faculté des Sciences Agronomiques de l'État, Gembloux (Belgique)

et

M. SEVERIN

Chaire de Chimie Générale et Organique, Faculté des Sciences Agronomiques de l'État, Gembloux (Belgique)

(Reçu le 21 janvier 1975)

SUMMARY

Quantitative determination of glycerides by densitometry

After determination of charring conditions and the measurement by densitometry of lipids separated by thin-layer chromatography, a statistical analysis was performed to determine the significance of the results. Calibration curves were studied and response factors calculated for some saturated and unsaturated triglycerides.

INTRODUCTION

Les mélanges de triglycérides, diglycérides, monoglycérides et acides gras libres, isolés à partir de milieux naturels ou synthétiques et séparables par diverses techniques chromatographiques, peuvent être dosés par différentes méthodes.

Pour des échantillons importants, les glycérides peuvent être séparés sur colonne et les fractions recueillies après élution estimées soit par pesée, soit par titrage iodométrique du glycérol libéré par hydrolyse¹. Pour des échantillons de l'ordre de 10 mg, les glycérides sont avantageusement séparés par chromatographie sur couches minces préparatives. Après grattage des plaques et extraction au chloroforme, les fractions peuvent être dosées par colorimétrie² ou par titrage du glycérol libéré par hydrolyse¹. Les quantités plus faibles de glycérides séparés sur plaques de couches minces peuvent être déterminées par densitométrie. Cette technique est appliquée au dosage de produits colorés³, de sucres après carbonisation⁴⁻⁶ et d'amines après révélation par le réactif de Dragendorff⁷. Vioque et Holman⁸ et Kaufmann et Mukherjee⁹ ont étudié le dosage d'esters gras. Privett *et al.*¹⁰, Privett et Blank¹¹, Naudet¹² et Wolff¹³ abordent le problème du dosage de lipides par densitométrie.

L'objet de ce travail est l'étude approfondie du dosage densitométrique de petites quantités de glycérides séparés par chromatographie sur couches minces (CCM). Nous déterminons les meilleures conditions de carbonisation en faisant varier le temps de chauffage des plaques placées dans une étuve à 187°. Nous effectuons une analyse de la variance pour connaître la variabilité des résultats obtenus en fonction du nombre de plaques utilisées et du nombre de mesures prises par plaque. Sur la base de ces données, nous construisons les courbes d'étalonnage de la tripalmitine, de l'acide palmitique, des dipalmitines 1/3 et 1/2 et de la monopalmitine. Enfin, nous déterminons les différences de carbonisation qui existent entre triglycérides saturés et insaturés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Séparation des glycérides

Les tri-, di- et monopalmitines synthétisées au laboratoire et les autres lipides fournis par Applied Science Labs. (Palo Alto, Calif., États-Unis) ou Fluka (Buchs, Suisse) sont séparés par CCM sur des plaques de Kieselgel G (Merck, No. 5721) de 0.25 mm d'épaisseur. Ces plaques finies offrent divers avantages par rapport aux plaques préparées au laboratoire: Elles réduisent le bruit de fond par leur composition et leur épaisseur plus constantes, augmentent la sensibilité en présentant des traits plus condensés et se détériorent plus difficilement au chauffage.

Après élution des lipides, dans des cuves Desaga, au moyen du mélange solvant: éther de pétrole-éther éthylique-acide formique (60:40:1.5), et révélation par carbonisation, le dosage des produits est effectué par densitométrie au moyen du spectromètre chromatographique Zeiss dérivé du PMQ II. La mesure des surfaces des pics est réalisée par planimétrie (Planimètre Amsler 2002/948).

Dosage des glycérides

Les lipides neutres saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés non conjugués absorbent peu les rayons UV ou visibles; c'est pourquoi, nous les révélons par carbonisation en vaporisant les plaques sous hotte avec une solution 50:50 de sulfate d'ammonium à 20% et de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 20% acidifié par H_2SO_4 (4%) au moment de l'utilisation¹⁴. Ces plaques sont ensuite placées dans une étuve à 187° pendant un temps que nous déterminons expérimentalement. (Voir détermination du temps de chauffage des plaques.) Les lipides, étalés sous forme d'un trait continu au moyen d'un applicateur Camag et d'une seringue Hamilton, sont dosés par densitométrie (longueur d'onde: 370 λ). La fente du densitomètre ayant une largeur de 14 mm et balayant les plaques perpendiculairement aux traits à une vitesse de 20 mm/min. Il est aisé de réaliser plusieurs mesures différentes par ligne.

RÉSULTATS

Détermination du temps de chauffage des plaques

Nous utilisons une même solution initiale contenant par 10 ml 83.3 mg de tripalmitine (Tri) et d'acide palmitique (Ac), 77.3 mg de dipalmitine 1/3 (Di 1/3), 6.05 mg de dipalmitine 1/2 (Di 1/2) et 26.2 mg de monopalmitine (Mo).

Après séparation de ces composés par CCM et pulvérisation de la solution de

TABLEAU I

ÉTUDE DES DENSITÉS DE NOIRCISSEMENT EN FONCTION DU TEMPS DE CHAUFFAGE DES PLAQUES

Surfaces en mm². Moyennes de dix mesures.

Temps (min)	Glycéride				
	Tri (47)*	Ac (47)	Di 1/3 (43.65)	Di 1/2 (3.42)	Mo (14.79)
30	1622	0	1896	522	298
60	3596	686	3639	1065	961
120	4963	3615	3709	1098	996
240	5021	4316	3649	1011	819
360	4529	4023	3622	939	752

* Concentration par 14 mm de trait (μg).

sulfate d'ammonium acidifié, nous plaçons les plaques dans une étuve à 187° pendant des temps variables (30–360 min) en vue de déterminer la durée du chauffage qui donne le meilleur noircissement. La température de l'étuve a été choisie en fonction d'essais préliminaires et du matériel mis à notre disposition.

Le Tableau I et la Fig. 1 indiquent que les différents glycérides ne noircissent pas avec la même vitesse. Il semble intéressant de chauffer les plaques pendant au moins 120 min.

Détermination du nombre de plaques et de passages par plaque

Une analyse statistique des résultats sert à déterminer le nombre de plaques et de passages nécessaires pour une variabilité fixée et permet l'étude d'une relation entre la concentration et la surface mesurée.

A partir de la même solution de lipides et après séparation par couches minces, des lots de cinq plaques sont révélés, après vaporisation de la solution de sulfate d'ammonium, dans l'étuve chauffée à 187° pendant 120, 240 et 360 min (temps de chauffage déterminés précédemment). Chaque essai est répété trois fois à raison d'un par jour. Cinq mesures densitométriques sont réalisées par plaque et par substance, ce qui donne un total de 75 données par produit et pour un même temps de chauffage.

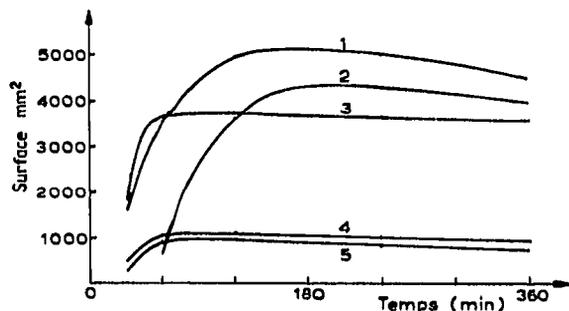


Fig. 1. Evolution de la carbonisation des lipides en fonction du temps de chauffage à 187°. 1 = tri-palmitine (47 $\mu\text{g}/14$ mm); 2 = acide palmitique (47 $\mu\text{g}/14$ mm); 3 = dipalmitine 1/3 (43.65 $\mu\text{g}/14$ mm); 4 = dipalmitine 1/2 (3.42 $\mu\text{g}/14$ mm); 5 = monopalmitine (14.79 $\mu\text{g}/14$ mm).

TABLEAU II

ANALYSE DE LA VARIANCE RÉALISÉE À PARTIR DES MESURES EFFECTUÉES AUX TEMPS 120, 240 ET 360 MIN

D°L = Degrés de liberté; SCE = somme des carrés des écarts; CM = carré moyen; F = variable de Snedecor; CV = coefficient de variation.

Source de variation		D°L	SCE	CM	F
Tri	Temps	2	10884184	5442092	61.77
	Jours/temps	6	299450	49908	< 1
	Plaques/jour	36	3171744	88104	21.00
	Passages	180	755160	4195	
	Total	224	15110538	5584299	
Moyenne générale: 4838; écart-type résiduel: 64.8; CV résiduel: 1.3					
Ac	Temps	2	18582912	9291456	87.96
	Jours/temps	6	776296	129383	1.22
	Plaques/jour	36	3802832	105634	6.95
	Passages	180	2735160	15195	
	Total	224	25897200	9541668	
Moyenne générale: 3985; écart-type résiduel: 123.3; CV résiduel: 3.1.					
Di 1/3	Temps	2	298497	149248	1.42
	Jours/temps	6	56488	9415	< 1
	Plaques/jour	36	3780528	105014	26.91
	Passages	180	702480	3902	
	Total	224	4837993	267579	
Moyenne générale: 3660; écart-type résiduel: 62.5; CV résiduel: 1.7.					
Di 1/2	Temps	2	948696	474348	50.00
	Jours/temps	6	16408	2735	< 1
	Plaques/jour	36	341542	9487	4.86
	Passages	180	351440	1952	
	Total	224	1658086	488522	
Moyenne générale: 1016; écart-type résiduel: 44.2; CV résiduel: 4.3.					
Mo	Temps	2	2383484	1191742	140.04
	Jours/temps	6	11273	1879	< 1
	Plaques/jour	36	306378	8510	7.77
	Passages	180	197280	1096	
	Total	224	2898415	1203227	
Moyenne générale: 856; écart-type résiduel: 33.1; CV résiduel: 3.9.					

Nous nous sommes limités à des lots de cinq plaques pour des raisons essentiellement matérielles. Par contre, le nombre de passages est fonction de la largeur de fente du densitomètre et de la longueur du dépôt.

Au schéma expérimental décrit ci-dessus correspond un modèle d'analyse de la variance hiérarchisé à deux critères de classification¹⁵. Chaque jour de l'expérience constitue une entité. Les plaques sont subordonnées aux jours et les passages ou répétitions dépendent des plaques. Les analyses effectuées aux trois temps différents (Tableau II) permettent la détermination des composantes de variances pour les plaques (σ_p^2) et pour les passages (σ_N^2). À partir de ces estimations, on calcule pour

des nombres de plaques (q) et de passages (n) la variance de la moyenne selon la relation

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{\sigma_p^2}{q} + \frac{\sigma_N^2}{qn}$$

ou

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{1}{q} \left(\sigma_p^2 + \frac{\sigma_N^2}{n} \right)$$

La variabilité relative au nombre de plaques et de passages est exprimée dans le Tableau III en terme de coefficients de variation. On constate que la variabilité entre les plaques est plus importante que la variabilité entre les mesures effectuées sur une même plaque.

De plus, à concentrations égales, le coefficient de variation de l'acide est nettement plus élevé que le coefficient de variation de la tripalmitine. Ce fait peut être expliqué par la difficulté qu'il y a à définir correctement la ligne de base des pics de l'acide.

TABLEAU III

COEFFICIENTS DE VARIATION PAR RAPPORT À LA MOYENNE CALCULÉS À PARTIR DE L'ENSEMBLE DES MESURES

Produit	n	q				
		1	2	3	4	5
Tri	1	2.99	2.12	1.73	1.50	1.34
	2	2.84	2.01	1.64	1.42	1.27
	3	2.79	1.97	1.61	1.39	1.25
	4	2.76	1.95	1.59	1.38	1.23
	5	2.74	1.94	1.58	1.37	1.23
Ac	1	4.58	3.24	2.64	2.29	2.05
	2	4.02	2.84	2.32	2.01	1.80
	3	3.82	2.70	2.20	1.91	1.71
	4	3.71	2.63	2.14	1.86	1.66
	5	3.65	2.58	2.11	1.82	1.63
Di 1/3	1	4.24	3.00	2.45	2.12	1.90
	2	4.07	2.88	2.35	2.03	1.82
	3	4.01	2.83	2.31	2.00	1.79
	4	3.98	2.81	2.30	1.99	1.78
	5	3.96	2.80	2.29	1.98	1.77
Di 1/2	1	5.79	4.09	3.34	2.89	2.59
	2	4.90	3.47	2.83	2.45	2.19
	3	4.57	3.23	2.64	2.29	2.04
	4	4.40	3.11	2.54	2.20	1.97
	5	4.29	3.03	2.48	2.14	1.92
Mo	1	5.93	4.19	3.43	2.97	2.65
	2	5.26	3.72	3.04	2.63	2.35
	3	5.02	3.55	2.90	2.51	2.25
	4	4.90	3.46	2.83	2.45	2.19
	5	4.82	3.41	2.78	2.41	2.16

TABLEAU IV

COEFFICIENTS DE VARIATION ($n=q=1$)

Temps (min)	Tri	Ac	Di 1/3	Di 1/2	Mo
120	4.76	7.19	6.63	7.31	8.03
240	1.28	3.11	2.09	5.25	2.63
360	1.22	2.96	2.17	3.55	3.91

L'examen des résultats obtenus pour des temps différents (Tableau IV), tout en confirmant les remarques précédentes, fait apparaître la nécessité de toujours travailler avec le même temps de chauffage des plaques. Les coefficients de variation au temps 120 min sont nettement plus élevés. Cela pourrait être provoqué par une stabilisation lente de l'étuve et une hétérogénéité dans le noircissement. Nous conseillons donc de chauffer les plaques pendant 240 min. On constate également qu'il n'y a pas de différences significatives entre les jours. Compte tenu de ces résultats, nous utiliserons trois plaques par essai et effectuerons trois mesures densitométriques par plaque et par composé.

Courbes d'étalonnage

En vue d'établir la relation liant la concentration Y ($\mu\text{g}/14$ mm de trait) en lipide à la surface de réponse X (mm^2), nous préparons des solutions de concentrations différentes. Les plaques, après élution, sont placées dans une étuve à 187° pendant 240 min. Pour chaque concentration et pour chaque produit, nous effectuons neuf mesures (trois plaques par jour, trois mesures par plaque).

La représentation graphique des résultats a orienté le choix des ajustements au sens des moindres carrés vers les fonctions de puissances. Une transformation logarithmique des données a permis la réduction de la variation résiduelle, la linéarisation de la relation et une correcte dispersion des observations. Dès lors, l'équation liant la concentration à la surface de réponse s'écrit

$$Y = aX^b$$

ou

$$\log Y = \log a + b \log X$$

TABLEAU V

PARAMÈTRES DES ÉQUATIONS DE RÉGRESSION

	Tri	Ac	Di 1/3	Di 1/2	Mo
\hat{m}_Y	53.2559	53.2474	54.8823	6.3933	33.1138
$\hat{\sigma}_Y$	84.4178	84.4068	80.8102	6.6827	30.0057
$Y = aX^b$					
a	$0.2032 \cdot 10^{-5}$	$0.2382 \cdot 10^{-5}$	$0.3069 \cdot 10^{-5}$	$0.2270 \cdot 10^{-5}$	$0.1726 \cdot 10^{-4}$
b	$0.1992 \cdot 10^1$	$0.2009 \cdot 10^1$	$0.2012 \cdot 10^1$	$0.2056 \cdot 10^1$	$0.2047 \cdot 10^1$
$\hat{\sigma}_{Y \cdot X}$	0.4400	0.4993	0.1828	0.0834	0.5831
$\hat{V}_{Y \cdot X}$	0.0083	0.0094	0.0033	0.0128	0.0176

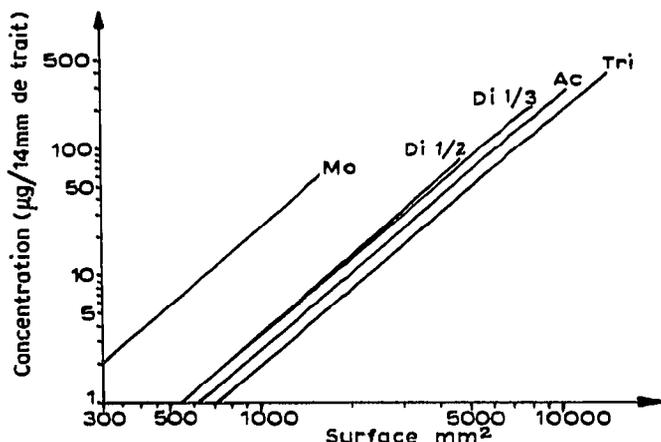


Fig. 2. Relations entre la concentration Y et la surface du pic X . Tri = tripalmitine; Ac = acide palmitique; Di = dipalmitine; Mo = monopalmitine.

Le Tableau V reprend pour chaque produit la moyenne (\hat{m}_Y) et l'écart-type estimé ($\hat{\sigma}_Y$) des concentrations, les valeurs des paramètres a et b , l'écart-type $\hat{\sigma}_{Y \cdot X}$ et le coefficient de variation $\hat{V}_{Y \cdot X}$ des résidus. La Fig. 2 donne une représentation graphique des équations en échelles logarithmiques.

Différences de carbonisation entre triglycérides

Comme les lipides étudiés précédemment ne se carbonisent pas avec la même vitesse, il nous semble intéressant d'étudier pour terminer les réponses de différents triglycérides. Si C est la concentration effective en triglycéride et Y la concentration calculée au moyen de l'équation de la droite de régression trouvée pour la tripalmitine en fonction de la surface du pic (X) mesurée par densitométrie, nous obtenons des coefficients de réponse (f_w) dont les valeurs sont colligées dans le Tableau VI.

TABLEAU VI
COEFFICIENTS DE RÉPONSE DES TRIGLYCÉRIDES

Triglycéride	R_F	% de carbone	f_w	$\frac{1}{f_w}$
Tributyryne	0.50	59.6	—	—
Triheptanoïne	0.67	67.3	3.783	0.264
Tricapryline	0.71	68.9	2.383	0.420
Tricaprine	0.77	71.5	1.627	0.615
Trilaurine	0.80	73.4	1.294	0.773
Trimyristine	0.83	74.8	1.136	0.880
Tripalmitine	0.87	75.9	1.000	1.000
Tristéarine	0.90	76.9	0.936	1.068
Tripalmitoléine	0.90	76.5	0.918	1.089
Trioléine	0.91	77.4	0.846	1.182
Trilinoléine	0.92	77.9	0.703	1.422
Trilinéoléine	0.92	78.4	0.545	1.835

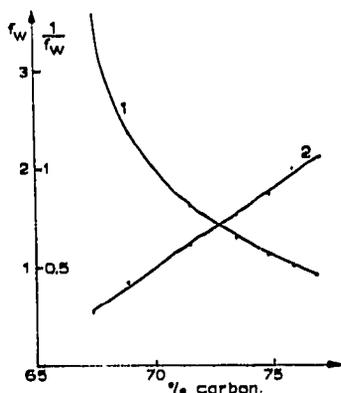


Fig. 3. Relation entre $1/f_w$ (2) et le pourcentage de carbone.

$$f_w = \frac{Y(\text{tripalmitine})}{Y(\text{triglycéride})} \times \frac{C(\text{triglycéride})}{C(\text{tripalmitine})}$$

On constate que la relation entre $1/f_w$ et le pourcentage en carbone est pratiquement linéaire (Fig. 3). De plus les doubles liaisons accentuent le noircissement.

CONCLUSIONS

L'analyse de lipides par densitométrie est une méthode sensible si on révèle les plaques en pulvérisant une solution de sulfate d'ammonium acidifié par H_2SO_4 et en les chauffant pendant 240 min à 187° . En examinant les résultats d'une analyse complète de la variance et en nous fixant une limite de variabilité, nous estimons qu'il est nécessaire d'utiliser pour chaque essai trois plaques et de répéter par plaque trois mesures à des endroits différents.

Par la méthode des droites de régression, nous montrons également que la relation entre la concentration (Y) et la surface du pic (X) est du type $\log Y = \log b + \alpha \log X$. Les différences de noircissement entre triglycérides nous obligent à émettre des réserves quant au dosage de lipides issus de milieux biologiques. En effet, dans pareils cas, le facteur de réponse ne peut être calculé car il dépend des concentrations des produits de même R_f . Cette méthode n'est valable que lorsqu'il n'y a qu'une substance par trait.

RÉSUMÉ

Les glycérides séparés par chromatographie sur couches minces et révélés par carbonisation sont dosés par densitométrie. Après la mise au point des conditions de carbonisation, l'analyse statistique détermine la variabilité des résultats; des courbes de calibration sont proposées et des facteurs de réponse sont calculés pour plusieurs triglycérides saturés et insaturés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Cl. Deroanne et M. Severin, *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 7 (1972) 59.
- 2 D. E. Walsh, O. J. Banasik et K. A. Gilles, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 278.
- 3 J. Dallas, *J. Chromatogr.*, 33 (1968) 337.
- 4 D. J. Bell et M. Q.-K. Talukder, *J. Chromatogr.*, 49 (1970) 469.
- 5 J. Mizelle, W. Dunlap et S. Wender, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 427.
- 6 M. Iglóy et A. Mizsei, *J. Chromatogr.*, 46 (1970) 207.
- 7 R. Bondivenne, N. Busch, J. Simond et A. Monteil, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 274.
- 8 E. Vioque et R. T. Holman, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 39 (1962) 63.
- 9 E. Kaufmann et K. D. Mukherjee, *Fette-Seifen-Anstrichm.*, 3 (1965) 183.
- 10 O. S. Privett, M. L. Blank et W. O. Lundberg, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 38 (1961) 312.
- 11 O. S. Privett et M. L. Blank, *J. Lipid Res.*, 1 (1961) 37.
- 12 M. Naudet, J. Pasero et S. Biasinis, *Rev. Fr. Corps Gras*, 8-9 (1965) 525.
- 13 J. P. Wolff, *Manuel d'analyse des corps gras*, Azoulay, Paris, 1968.
- 14 T. Zimiński et E. Borowski, *J. Chromatogr.*, 23 (1966) 480.
- 15 P. Dagnelie, *Théorie et méthodes statistiques*, Vol. I et II, Presses Agronomiques, Gembloux, 1969-1970.