

Détermination des mono- et diglycérides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) = Determination of mono- and diglycerides by high performance liquid chromatography (HPLC)

Autor(en): **Martin, E. / Duret, Monique / Vogel, J.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **79 (1988)**

Heft 4

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982594>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Détermination des mono- et diglycérides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Determination of Mono- and Diglycerides by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

*E. Martin**, *Monique Duret* et *J. Vogel*
Laboratoire cantonal de chimie, Genève

Introduction

La chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice est la méthode la plus simple pour séparer les corps gras en tri-, di-, monoglycérides et acides gras. En tant que méthode qualitative (1), elle a été retenue dans le projet de chapitre 58 sur les émulsifiants du Manuel suisse des denrées alimentaires en cours d'élaboration. Des essais comparés de CCM suivies de mesures densitométriques effectués par plusieurs laboratoires participant à l'élaboration de ce projet ont démontré que la CCM ne permet pas un dosage reproductible des mono- et diglycérides.

Etant donné que les mono- et diglycérides représentent plus de 75% (2) de la totalité des émulsifiants alimentaires et que des teneurs maximales ont été fixées dans la liste d'application de l'ordonnance sur les additifs (3) il est nécessaire, pour les besoins du contrôle, d'avoir une méthode précise pour déterminer cette catégorie d'additifs.

La chromatographie gaz-liquide avec détection à ionisation de flamme a été très utilisée (4—10). Elle ne convient cependant pas particulièrement bien aux émulsifiants qui sont des substances peu volatiles. Après saponification elle permet une identification très fine des éléments constitutifs des émulsifiants mais elle ne permet pas par ce biais un dosage sûr en raison de la très grande marge de fluctuation de ces éléments pour un même type d'émulsifiant.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a déjà été utilisée pour l'étude analytique et structurale de divers émulsifiants (11—13). Elle a aussi été appliquée à l'identification et au dosage des corps gras, principalement des triglycérides (14—17). Elle a l'avantage sur la CCM de permettre un dosage précis.

* Membre de la sous-commission 23 et de la commission du Manuel suisse des denrées alimentaires.

Pour les colonnes, la silice inverse et la silice ont été utilisées. Nous avons choisi la silice comme phase stationnaire car ce support offre la meilleure compatibilité avec les solvants des corps gras. De plus nous savons, par la CCM, que la silice sépare bien les mono-, des di- et triglycérides. Des détecteurs infra-rouge (18), à diffusion de lumière (19), photométriques dans l'ultra-violet (20), réfractométrique (21, 22) et même un détecteur avec réaction post-colonne ont été proposés (23). Nous avons opté pour le détecteur réfractométrique car c'est celui qui donne une réponse relativement constante à l'intérieur d'une même classe de composés lipidiques. Nous avons recherché la phase mobile présentant l'indice de réfraction le plus bas et permettant une séparation optimale des mono- et diglycérides. Précédée d'une phase d'enrichissement sur minicolonne (24), la HPLC est la méthode de choix pour la détermination précise des mono- et diglycérides. La méthode qui a été mise au point permet de déterminer quantitativement les mono- et diglycérides. L'examen des profils chromatographiques entre les mono- et les diglycérides renseigne sur la présence de mono- et diglycérides estérifiés avec les acides citrique, lactique, tartrique, diacétyltartrique, acétique. Les mono- et diesters du propanediol-1,2 peuvent aussi être dosés par cette méthode.

Partie expérimentale

Réactifs

Hexane (Mallinckrodt, ChromAR, HPLC, No 5167)
Propanol-2 (Merck, pour l'analyse des résidus, No 998)
Acide perchlorique 60% p. a. (Merck No 518)
Glycérol-1 monopalmitate (Fluka No 76185)
Glycérol-1,2 dipalmitate (Fluka No 42554)
Glycérol-1,3 dipalmitate (Fluka No 52555)
Acide palmitique p. a. (Fluka No 76120)

Appareillage

Chromatographe liquide à haute performance Varian, modèle Vista 5000 avec détecteur réfractométrique Varian RI-3.
Injecteur Rheodyne 7125 manuel avec boucle de 10 μ l.
Bain thermostaté Julabo avec cuve de 20 litres et circulation externe type HC reliée à la cellule réfractométrique.
Enregistreur intégrateur Spectra-Physics 4270.
Seringue Hamilton de 100 μ l, 710-SNR 80665 pour injecteur Rheodyne.
Filtres 0,45 μ m (Millipore SJHVLO4NS).

Chromatographie

Phase mobile: Hexane + propanol-2 + eau + acide perchlorique (1075 ml + 125 ml + 25 ml + 0,625 ml); débit 1 ml/minute.

Température de la colonne: Ambiante.

Température de la cellule réfractométrique: $20,00 \pm 0,01$ °C.

Pression 82 bar.

Atténuation du détecteur réfractométrique: 5–20 (dRI $\times 10^{-6}$).

Solutions témoins préparées dans la phase mobile.

Solution de référence: Peser avec précision environ 20 mg des substances suivantes:

- glycérol-1 monopalmitate
- glycérol-1,2 dipalmitate
- glycérol-1,3 dipalmitate
- huile d'olive raffinée.

Compléter au trait avec la phase mobile. A température ambiante, cette solution est stable 24 heures.

Résultats et commentaires

La régression linéaire et la détermination du coefficient de corrélation pour différentes concentrations de glycérol-1 monopalmitate permettent de constater que l'intensité du signal enregistré (surface d'intégration) est bien proportionnelle à la concentration du glycérol-1 monopalmitate. Le coefficient de corrélation de 0,9995 indique un bon degré d'ajustement avec la droite calculée dans l'intervalle de concentration étudié (1–10 mg/ml).

L'étude de répétabilité a été effectuée selon les normes ISO (25). Les conditions et les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau 1.

Les temps de rétention du glycérol-1 monopalmitate ainsi que ceux du glycérol-1, 2 dipalmitate et du glycérol-1,3 dipalmitate accusent une dérive positive de 0,01 seconde sur 10 minutes (intervalle de temps entre 2 injections).

Tableau 1. Répétabilité

Paramètre	Substance	a)	b) + c)
Concentration (mg/ml)		3,27	1,44 + 1,61
Nombre de chromatogrammes effectivement utilisés		9	7
Nombre de chromatogrammes éliminés comme aberrants		0	1
Intervalle de confiance unilatéral au niveau de confiance 95% (en %)		3,7	8,8

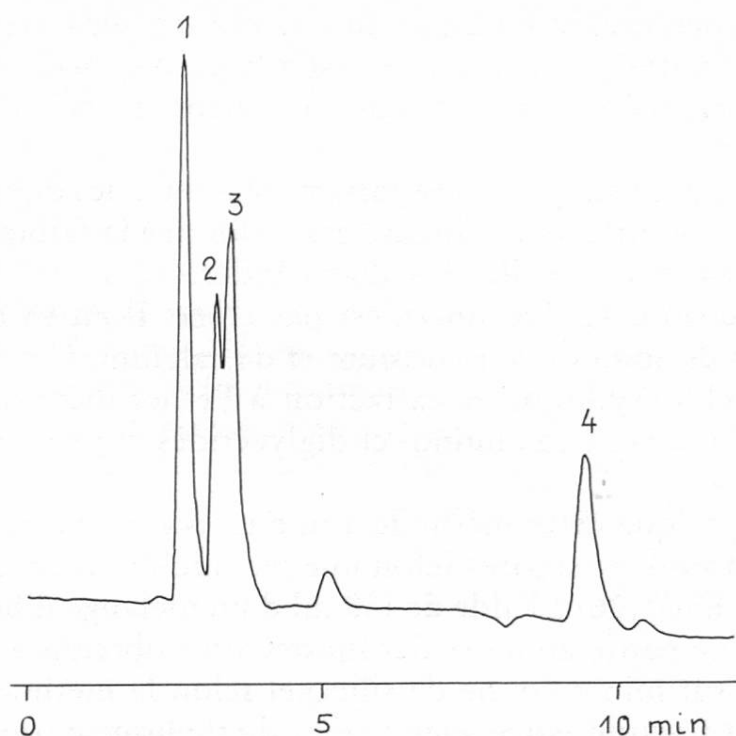


Fig. 1. HPLC, conditions voir texte

- | | |
|--|-------------------------------|
| 1 = Triglycérides (huile d'olive raffinée) | 3 = Glycérol-1, 2 dipalmitate |
| 2 = Glycérol-1, 3 dipalmitate | 4 = Glycérol-1 monopalmitate |

La figure 1 montre un exemple de chromatogramme obtenu avec la solution de référence. Les pics du glycérol-1,2 dipalmitate et du glycérol-1,3 dipalmitate ne sont pas parfaitement séparés et dans le cas d'un dosage, il faut cumuler ces deux pics. Le pic des triglycérides est assez bien séparé des pics des diglycérides.

Il a été constaté que les triglycérides de l'huile d'olive ont pratiquement le même temps de rétention que celui de la tripalmitine. Dans les conditions données, l'acide palmitique n'est pas séparé des diglycérides correspondants. Dans la pratique cela ne devrait pas être gênant les acides gras libres n'étant présents qu'à des concentrations relativement faibles par rapport à celles des mono- et diglycérides.

Les profils chromatographiques entre les diglycérides et les monoglycérides renseignent sur la présence de mono- et diglycérides estérifiés avec les acides citrique, lactique, tartrique, diacétyltartrique et acétique. Les diesters des acides gras alimentaires du propanediol-1,2 donnent un pic qui se superpose à celui des triesters de ces mêmes acides gras. Les monoesters des acides gras alimentaires du propanediol-1,3 donnent un pic qui se superpose au pic des diglycérides de ces acides gras.

Il est clair qu'au vu de ces résultats, une identification précise des composants d'un mélange d'émulsifiants n'est pas possible. Pour les déterminations quantitatives, nous avons choisi d'exprimer les résultats en di- et monoesters d'acides gras alimentaires du glycérol (mono- et dipalmitates par exemple). L'erreur qui peut résulter d'une telle simplification est de toute façon minime comparée à celle

qui résulte d'une détermination basée sur les constituants acides obtenus après saponification des mono- et diglycérides estérifiés. La concentration d'un constituant acide, pour un même type d'émulsifiant, peut en effet varier du simple au quadruple.

Le cholestérol donne un pic qui se superpose à ceux des diglycérides. Cette interférence n'a qu'une influence mineure étant donnée la faible concentration de ce composé par rapport à celle des diglycérides.

Dans ces conditions la lécithine n'est pas éluée. Il en va de même pour les stéaroyl-lactylates de sodium de potassium et de calcium. Ces derniers après traitement à l'acide chlorhydrique et extraction à l'éther diéthylique donnent des profils comparables à ceux des mono- et diglycérides et peuvent alors être quantifiés.

Nous avons appliqué cette méthode à une margarine végétale du commerce. Les lipides ont d'abord été séparés selon une technique sur colonne sèche dérivée de la méthode de *Wolff* (26) à l'aide de 150 ml d'un mélange d'hexane et de propanol-2 (3:2 v/v). Une partie aliquote des lipides ainsi obtenus a été soumise à une chromatographie sur minicolonne de silicagel selon la méthode de *Dieffenbacher* et *Martin* (24). La fraction éluée avec l'éther diéthylique et qui contient les mono- et les diglycérides a été soumise à la HPLC et a donné les résultats suivants: Monoglycérides (en glycérol-1 monopalmitate): 0,17 g/100g.

Diglycérides exprimés en glycérol-1,3 et glycérol-1,2 dipalmitate: 4,7 et 4,9 g/100 g (2 dosages).

En conclusion, la méthode HPLC décrite permet de déterminer avec précision les teneurs en mono- et diglycérides.

Résumé

Une méthode HPLC sur colonne de silice, avec détection réfractométrique est proposée pour la détermination précise des mono- et des diglycérides. L'examen du profil chromatographique renseigne sur la présence de mono- et diglycérides estérifiés. Dans les conditions opératoires décrites, les limites de détection sont de 0,2 mg/ml pour le glycérol-1 monopalmitate et de 0,1 mg/ml pour le glycérol-1,2 et le glycérol-1,3 dipalmitates. La réponse du détecteur est linéaire pour le glycérol-1 palmitate dans un intervalle de concentration compris entre 1 et 10 mg/ml. La répétabilité est inférieure à 3,7% pour la monopalmitine. Elle est inférieure à 8,8% pour la dipalmitine. La méthode s'applique également aux esters du propandiol-1,2 et d'acides gras.

Zusammenfassung

Es wird eine HPLC-Methode über Silicagel (Direktphase) mit refraktometrischer Messung für die Bestimmung von Mono- und Diglyceriden vorgeschlagen. Das Chromatogramm unterrichtet über die etwaige Anwesenheit von veresterten Mono- und Diglyceriden. Unter bestimmten Bedingungen betragen die Nachweisgrenzen für 1-Monopalmitin und für 1,2- und 1,3-Dipalmitin 0,2 mg/ml bzw. 0,1 mg/ml. Das Signal des Detektors für 1-Monopalmitin ist linear zwischen 1–10 mg/ml. Die Wiederholbarkeit für Mono- und Di-

palmitin ist kleiner als 3,7% bzw. 8,8%. Die Methode ist für Propylenglykolester von Fettsäuren anwendbar.

Summary

A direct phase HPLC method with refractometric detection is proposed for the determination of mono- and diglycerides. The chromatographic profile gives information on the presence of esterified mono- and diglycerides. Under the experimental conditions the detection limits are 0.2 mg/ml for 1-palmitoylglycerol and 0.1 mg/ml for 1,2-dipalmitoylglycerol and 1,3-dipalmitoylglycerol respectively. The response of the detector for 1-palmitoylglycerol is linear between 1 and 10 mg/ml. The repeatability for monopalmitin is less than 3.7% it is less than 8.8% for dipalmitin. The method is also applicable to the fatty esters of 1,2-propanediol.

Bibliographie

1. *Martin, E.*: Chromatographie sur couche mince des émulsifiants. *Trav. chim. aliment. hyg.* **72**, 402–410 (1981).
2. *Dieffenbacher, A. et Martin, E.*: Le dosage des émulsifiants dans les denrées alimentaires: Séparation des lipides polaires et des lipides apolaires par chromatographie sur minicolonne de gel de silice. *Rev. franç. Corps gras* **34**, 324–326 (1987).
3. Ordonnance sur les additifs admis dans les denrées alimentaires du 20 janvier 1982 (état le 1er avril 1985) et modification du 4 novembre 1987. Office central fédéral des imprimés et du matériel, Berne.
4. *Mariani, C. e Fedeli, E.*: I gliceridi parziali degli oli vegetali. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **62**, 129–132 (1985).
5. *Goh, E. M. and Timms, R. E.*: Determination of mono- and diglycerides in palm oil, olein and stearin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 730–734 (1985).
6. *Riva, M., Daghetta, A. e Galli, M.*: Analisi gascromatografica ad alta risoluzione dei mono e dei digliceridi con colonna capillare persilanizzata associata al sistema di introduzione diretta in colonna. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **58**, 432–444 (1981).
7. *Neckermann, E. F. and Noznick, P. P.*: Gas-liquid chromatographic analysis of lactoylated monoglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **45**, 845–847 (1968).
8. *Sahasrabudhe, M. R. and Legari, J. J.*: Gas-liquid chromatographic analysis of mono- and diglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **44**, 379–380 (1967).
9. *Halvarson, H. and Qvist, O.*: A method to determine the monoglyceride content in fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51**, 162–165 (1974).
10. *Soe, J. B.*: Analyses of monoglycerides and other emulsifiers by gaschromatography. *Fette, Seifen, Anstrichm.* **85**, 72–76 (1983).
11. *Sudraud, G., Coustard, J. M., Retho, C., Caude, M., Rosset, R., Hagemann, R., Gaudin, D. and Virelizier, H.*: Analytical and structural study of some food emulsifiers by high-performance liquid chromatography and off-line mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **204**, 397–406 (1981).
12. *Brüschweiler, H.*: Analyse von nichtionogenen grenzflächenaktiven Verbindungen (Emulgatoren) mittels Hochdrucksäulenchromatographie. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.* **68**, 46–63 (1977).

13. *Hurst, W. J. and Martin, Jr., R. A.*: The HPLC separation and quantitation of lecithin in chocolate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 307–310 (1980).
14. *Perrin, J.-L. et Naudet, M.*: Identification et dosage des triglycérides des corps gras naturels par CLHP. *Rev. Franç. Corps Gras* **30**, 279–285 (1983).
15. *Goiffon, J.-P., Reminiac, C. et Olle, M.*: Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. I – Recherche des meilleures conditions opératoires. Cas de l'huile de soja. *Rev. Franç. Corps Gras* **28**, 167–207 (1981).
16. *Shukla, V. K. S., Schiotz, W. and Batsberg, W.*: A simple and direct procedure for the evaluation of triglyceride composition of cocoa butters by high performance liquid chromatography – A comparison with the existing TLC-GC method. *Fette, Seifen, Anstrichm.* **85**, 274–278 (1983).
17. *Greenspan, M. D. and Schroeder, E. A.*: Separation and detection of neutral lipids and free fatty acids in a liver extract by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **127**, 441–448 (1982).
18. *Hamilton, R. J., Mitchell, S. F. and Sewell, P. A.*: Techniques for the detection of lipids in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **395**, 33–46 (1987).
19. *Perrin, J.-L., Prévot, A., Stolyhwo, A. et Guiochon, G.*: Utilisation d'un détecteur à diffusion de la lumière dans l'analyse des corps gras par CLHP. *Rev. Franç. Corps Gras* **31**, 495–501 (1984).
20. *Riisom, T. and Hoffmeyer, L.*: High performance liquid chromatography analysis of emulsifiers: I. Quantitative determination of mono- and diacylglycerols of saturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 649–652 (1978).
21. *Foglia, T. A., Vail, P. D. and Iwama, T.*: High performance liquid chromatographic analysis of 1-alkyl-2-acyl and 1-alkyl-3-acyl-sn-glycerols. *Lipids* **22**, 362–365 (1987).
22. *Ritchie, A. S. and Jee, M. H.*: High performance liquid chromatographic technique for the separation of lipid classes. *J. Chromatogr.* **329**, 273–280 (1985).
23. *Takano, S. and Kondoh, Y.*: Monoglyceride analysis with reversed phase HPLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 1001–1003 (1987).
24. *Dieffenbacher, A. et Martin, E.*: Le dosage des émulsifiants dans les denrées alimentaires. Séparation des lipides polaires et des lipides apolaires par chromatographie sur minicolonne de gel de silice. *Rev. franç. Corps gras* **34**, 324–326 (1987).
25. Recueil de normes ISO 3, 2ème édition, Méthodes statistiques. Association suisse de normalisation, Zürich 1981.
26. *Wolff, R. L.*: Mise au point et évaluation d'une méthode d'extraction de la matière grasse de fromage de type emmental. *Rev. franç. Corps gras* **34**, 123–132 (1987).

Dr E. Martin
 Monique Duret
 Dr J. Vogel
 Laboratoire cantonal de chimie
 Case postale 166
 CH-1211 Genève 4