**TP Chromatographie Gazeuse**

Huile

Ce TP a pour objectif de déterminer la composition en acide gras d’une huile inconnue, et ainsi à partir des résultats obtenus identifier cette huile.

1. **Principe de l’analyse**

Cette analyse repose sur la séparation des différents composés, qui seront étudiés qualitativement et quantitativement par la suite. Pour cela les molécules sont rendues volatiles par saponification et estérification des triglycérides contenus dans l’huile, en entrant dans la colonne. Le mélange est transporté par un gaz vecteur le long de la colonne de séparation thermostatée où est située la phase stationnaire. Ainsi les molécules vont être séparées en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire, elles sortiront à des temps différents. Le transport des composés dans la colonne est favorisé pour une température donnée du four, celle-ci étant inférieure à la température d’ébullition des composés. En sortant ils sont dirigés vers le détecteur qui transmettra leur signal à un enregistreur.

La chromatographie gazeuse réalisée est en mode gradient.

1. **Quel sera l’ordre de sortie d’un mélange d’alcanes de 19 à 25 atomes de carbone en solution dans l’hexane ?**

Les composés sont en premier séparés en fonction de leur nombre de Carbone, ainsi plus une molécule est petite, plus elle est entrainée par la phase mobile. Elle sortira en premier de la colonne.

On obtient l’ordre de sortie suivant C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25

**Quel sera l’ordre de sortie des acides gras suivants (en solution dans l’hexane) ?**

Après le poids moléculaire, on sépare les molécules en fonction de leur polarité. En effet les Acides Gras insaturés possèdent une ou plusieurs doubles liaisons, donc ils sont plus polaires. La phase stationnaire étant polaire, elle retient molécule très polaire.

On obtient l’ordre de sortie suivant C12, C14, C16, C18, C16 :1, C18 :1, C18 :2, C18 :3

1. **Tracer courbe à partir chromatogramme « alcane »**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nombre de Carbone** | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 |
| **Indice de Rétention** | 1600 | 1700 | 1800 | 1900 | 2000 | 2100 | 2200 | 2300 | 2400 | 2500 | 2600 | 2700 | 2800 | 2900 |
| **Temps de Rétention** | 3,283 | 3,768 | 4,487 | 5,535 | 6,933 | 8,658 | 10,64 | 12,778 | 15,006 | 17,245 | 19,47 | 21,69 | 23,91 | 26,14 |

1. **En fonction de la droite de régression, on obtient pour les constituants de l’alcane étalon les valeurs suivantes :**

Pour le pic C14, I=1879,6 ; pour le pic 1, I=2022,9 ; pour le pic 2, I=2278,5 ; pour le pic 3, I=2312,6 ; pour le pic 4, I=2389,4 ; pour le pic 5, I=2473,1

1. **Identification des acides gras méthylés**

Les indices de rétention des constituants de l’échantillon d’huile sont identifiés par la droite d’étalonnage, mais aussi par calcul, à l’aide de la formule suivante :

On utilise la formule de Kratz et Van den Dool car c’est un système en gradient (la température du four augmente progressivement).

tRx-tRn

I= 100 x

+ 100 x n

tRn+1-tRn

On récapitule dans un tableau les valeurs trouvées pour les 2 huiles étudiées (C et D) :

Huile C :

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre de Carbone | Tr (min) | I (droite) | I (calcul) | Acides gras méthylés |
| C 14 | 5,80 | 1875,8 | 1919,0 | Acide myristique |
| C 16 | 8,45 | 2019,1 | 2087,9 | Acide palmitique |
| C 18 | 13,20 | 2275,8 | 2318,9 | Acide stéarique |
| C 18 :1 | 13,98 | 2318,0 | 2353,9 | Acide oléique |
| C 18 :2 | 15,10 | 2378,5 | 2404,2 | Acide linoléique |
| C 18 :3 | 16,77 | 2468,8 | 2478,8 | Acide linolénique |

Huile D :

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Nombre de Carbone | Tr (min) | I (droite) | I (calcul) | Acide gras méthylés |
| C 14 | 5,78 | 1874,6 | 1917,5 | Acide myristique |
| C 16 | 8,43 | 2018,0 | 2086,8 | Acide palmitique |
| C 18 | 13,18 | 2274,8 | 2318,0 | Acide stéarique |
| C 18 :1 | 13,87 | 2312,1 | 2349,0 | Acide oléique |
| C 18 :2 | 15,20 | 2383,9 | 2408,7 | Acide linoléique |
| C 18 :3 | 16,78 | 2469,4 | 2478 ,8 | Acide linolénique |

1. **Déterminer la composition en acides gras de l’huile analysée en % des acides gras totaux**

Afin de pouvoir identifier nos 2 échantillons d’huile, on évalue les teneurs des différents Acides Gras.

Huile C :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Acide gras méthylés | Aire | C’i (mg/mL) | % AG totaux |
| Acide myristique | 1749,69 | 2,00 | 59,6 |
| Acide palmitique | 276,92 | 0,32 | 9,4 |
| Acide stéarique | 88,84 | 0,10 | 3,0 |
| Acide oléique | 2317,18 | 2,65 | 79,0 |
| Acide linoléique | 228,43 | 0,26 | 7,8 |
| Acide linolénique | 22,13 | 0,03 | 0,8 |
| Total : | 2933,5 |

Huile D :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Acide gras méthylés | Aire | C’i (mg/mL) | % AG totaux |
| Acide myristique | 1096,20 | 2,00 | 51,8 |
| Acide palmitique | 133,54 | 0,24 | 6,3 |
| Acide stéarique | 53,43 | 0,10 | 2,5 |
| Acide oléique | 779,12 | 1,42 | 36,8 |
| Acide linoléique | 1143,52 | 2,10 | 54,1 |
| Acide linolénique | 5,92 | 0,01 | 0,3 |
| Total : | 2115,53 |

1. **Identification de l’huile analysée**

A partir du tableau qui regroupe la composition en acides gras des principales matières grasses alimentaires, on détermine notre huile.

Huile d’Olive

On remarque que notre échantillon C a des résultats similaires à ceux de cette huile.

Ainsi, **l’huile** **C** équivaut à **l’huile d’Olive**.

|  |  |
| --- | --- |
| Acide Gras | % |
| C 16 | 13 |
| C 16 :1 | 1 |
| C 18 | 3 |
| C 18 :1 | 70 |
| C 18 :2 | 10 |
| C 18 :3 | 1 |

|  |  |
| --- | --- |
| Acide Gras | % |
| C 16 | 12 |
| C 18 | 2 |
| C 18 :1 | 30 |
| C 18 :2 | 55 |
| C 18 :3 | 1 |

Huile de Maïs

Les résultats concordant avec notre échantillon D sont celui de l’huile de Maïs.

Ainsi, **l’huile D** est **l’huile de Maïs**

On remarque que l’huile d’olive est composée d’un acide palmitoléique (1%), il est présent sur notre chromatogramme, mais comme son pic est extrêmement faible, on ne l’a pas analysé. Cependant sa présence permet d’identifier plus rapidement l’échantillon. Certains pourcentages en AG sont vraiment différents des % références, ce qui rend l’identification plus difficile. Cependant, il faut regarder s’il y a présence ou absence de pics sur notre chromatogramme. En effet, pour l’huile D, nous avons hésité entre l’huile de maïs et celle de tournesol, or pour cette dernière il n’y a pas d’acide gras C18 :3. Ainsi on en a déduit que c’était l’huile de maïs.

Calcul d’erreur : AG attendu - %AG obtenu

%AG attendu

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Acide Gras | Huile C (% erreur) | Huile D (% erreur) |
| C 16 | 27,7 | 47,5 |
| C 18 | 0,0 | 25 |
| C 18 :1 | 12,9 | 22,6 |
| C 18 :2 | 22 | 1,6 |
| C 18 :3 | 20 | 70 |

Ces pourcentages d’erreurs sont dus à des erreurs de manipulations, par exemple lorsqu’il a fallu récupérer les EMAG à la pipette. Puisque la totalité n’a pas pu être recueillie, au risque d’emporter la phase supérieure lors du prélèvement. De plus, il y aussi les erreurs de pesée qui rentre en compte.

Lors de ce TP, on manipule de faible volume, ainsi il y a perte de l’échantillon à chaque étape. Pour les éviter on a utilisé la méthode de l’étalon interne, soit une perte identique sur l’échantillon et l’étalon.

**Conclusion :**

La CPG a la particularité de travailler sur des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale adaptée, sans qu’il y ait volatilisation du substrat, et bien sur de fonctionner en circuit étanche aux gaz. L’analyse quantitative est réalisée par étalonnage interne, ainsi le choix de cet étalon est important, il est choisi parmi les critères suivant : Tps de rétention et concentration proche des éléments dosés, être bien séparé des autres constituants… Cette méthode est précise.