



HAL
open science

Huile de noix : paramètres qui influencent son rancissement, méthodes d'étude et possibilité de protection

Hélène Péra

► **To cite this version:**

Hélène Péra. Huile de noix : paramètres qui influencent son rancissement, méthodes d'étude et possibilité de protection. Sciences pharmaceutiques. 1998. dumas-01317395

HAL Id: dumas-01317395

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01317395>

Submitted on 18 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2^e exemplaire



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FALCULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 1998

N° D'ordre : 7010

HUILE DE NOIX

Paramètres qui influencent son rancissement

Méthodes d'étude et possibilité de protection

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE



PÉRA Hélène

*[Données à caractère
personnel]*

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 02 Avril 1998 à 17H30

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Madame le Professeur ALARY Président du jury
Madame BLANC
Madame ESNAULT
Monsieur SION

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FALCULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 1998

N° D'ordre :

HUILE DE NOIX

Paramètres qui influencent son rancissement

Méthodes d'étude et possibilité de protection

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

PÉRA Hélène

*[Données à caractère
personnel]*

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 02 Avril 1998 à 17H30

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Madame le Professeur ALARY Président du jury
Madame BLANC
Madame ESNAULT
Monsieur SION

Madame le Professeur Alary, m'a dirigée tout au long de ce travail, en me prodiguant ses conseils constructifs et son aide scientifique. J'ai pu apprécier tout au long de cette année ses grandes qualités humaines.

Je tiens à la remercier tout particulièrement.

Madame Esnault m'a guidée pour ce travail. Sa grande compétence et sa rigueur scientifique m'ont été d'un grand secours.

Je la remercie pour tout.

Madame Blanc et Monsieur Sion ont accepté de faire bénéficier ce jury de leur compétence.

Qu'ils en soient ici remerciés.

Madame Villet et Madame Ravel m'ont guidée avec leur savoir-faire scientifique et une grande disponibilité.

Je les en remercie très sincèrement.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui travaillent au sein du laboratoire de Chimie Analytique, et en particulier Aline Serrano.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur A. FAVIER

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

AGNIUS-DELORD	Claudine	Physique Pharmacie
ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
ROCHAT	Jacques	Hygiène environnement Droit et Economie Pharmaceutiques
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

INTRODUCTION.....	p 1
I. L'huile de noix.....	p 2
<i>I.1. Fabrication et production de l'huile de noix.....</i>	<i>p 2</i>
<i>I.2. Composition.....</i>	<i>p 3</i>
<i>I.3. Intérêt nutritionnel.....</i>	<i>p 5</i>
II. Phénomène de rancissement.....	p 6
<i>II.1. Mécanisme du rancissement.....</i>	<i>p 6</i>
<i>II.2. Facteurs initiateurs du phénomène de rancissement.....</i>	<i>p 10</i>
III. Mise en évidence de l'évolution d'une huile de noix en fonction des conditions de stockage.....	p 10
<i>III.1. Echantillonnage et stockage.....</i>	<i>p 10</i>
<i>III.2. Détermination de l'indice d'acide.....</i>	<i>p 12</i>
<i>III.2.1. Différentes méthodes de dosage.....</i>	<i>p 12</i>
<i>III.2.2. Définition et principe de la méthode.....</i>	<i>p 12</i>
<i>III.2.3. Mode opératoire et expression des résultats.....</i>	<i>p 13</i>
<i>III.2.4. Résultats et interprétation.....</i>	<i>p 15</i>
<i>III.2.5. Conclusion.....</i>	<i>p 17</i>
<i>III.3. Détermination de l'indice de carbonyle.....</i>	<i>p 18</i>
<i>III.3.1. Différentes méthodes de dosage.....</i>	<i>p 18</i>
<i>III.3.2. Méthode titrimétrique.....</i>	<i>p 18</i>
<i>III.3.3. Utilisation d'un potentiomètre.....</i>	<i>p 20</i>
<i>III.3.4. Conclusion.....</i>	<i>p 21</i>

III.4. Dosage des peroxydes	p 22
III.4.1. Différentes méthodes de dosage.....	p 22
III.4.2. Méthode titrimétrique: indice de peroxyde.....	p 23
a. Définition et principe de la méthode	
b. Mode opératoire	
c. Expression des résultats	
d. Résultats et interprétation	
III.4.3. Méthode spectrophotométrique (FOX).....	p 28
a. Principe de la méthode	
b. Mode opératoire	
c. Expression des résultats	
d. Résultats et interprétation	
III.4.4. Méthode ampérométrique.....	p 33
III.4.4.1. Matériel.....	p 33
III.4.4.2. Méthodes.....	p 36
III.4.4.3. Travaux personnels.....	p 37
a. Peroxydation des acides gras	
b. Etude spectrophotométrique	
c. Essais ampérométriques	
III.4.4.4. Discussion.....	p 46
III.4.5. Conclusion.....	p 48
III.5. Recherche des hydrocarbures de faible poids moléculaire	p 50
III.5.1. Principe de la méthode.....	p 50
III.5.2. Dosage par CPG.....	p 50
III.5.3. Préparation des échantillons.....	p 53
III.5.4. Résultats et interprétation.....	p 54
III.5.5. Bilan et conclusion.....	p 62
III.6. Dosage des tocophérols	p 63
III.6.1. Les tocophérols.....	p 63
III.6.2.1. Structure des tocophérols.....	p 63
III.6.2.2. Activité des tocophérols.....	p 64
III.6.2.3. Origine des tocophérols.....	p 64
III.6.2.4. Dosage des tocophérols.....	p 64
III.6.2 . Les tocophérols de l'huile de noix.....	p 65
III.6.2.1. Principe de la méthode.....	p 65
III.6.2.2. Technique chromatographique.....	p 65
III.6.3. Préparation des échantillons.....	p 68

<i>III.6.4. Résultats et interprétation.....</i>	<i>p 69</i>
III.6.4.1.Calcul de la concentration en tocophérol dans l'huile de noix.....	<i>p 69</i>
III.6.4.2.Résultats	<i>p 70</i>
A. Chromatogrammes.....	<i>p 70</i>
B. Tableaux.....	<i>p 70</i>
1. Echantillons témoins	
2. Huile de noix sans ajout de tocophérol	
3. Huile de noix avec ajout d' α ou de γ tocophérol	
- Ajout d' α tocophérol	
- Ajout de γ tocophérol	
<i>III.6.5.Evolution au cours du stockage.....</i>	<i>p 79</i>

CONCLUSION.....	p 81
------------------------	-------------

INTRODUCTION

Le rancissement d'une huile est un phénomène bien connu. Il altère les aliments entraînant ainsi l'apparition d'odeurs et de goûts désagréables.

De nombreux travaux sur l'huile ayant déjà été effectués au laboratoire de chimie analytique du Professeur Alary, nous avons choisi l'huile de noix pour étudier ce phénomène de rancissement.

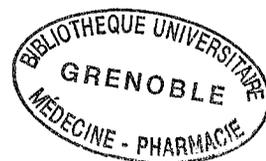
L'altération d'une huile de noix est essentiellement due à l'oxydation des lipides entraînant une coupure des acides gras et la formation de composés peroxydés, carbonylés et acides.

Nous avons voulu mettre en évidence les facteurs influençant la dégradation d'une huile et son évolution dans le temps, en évaluant :

- l'indice de carbonyle
- l'indice d'acide
- l'indice de peroxyde
- la présence d'hydrocarbures de faible poids moléculaire, comme par exemple l'hexane.

Nous avons également dosé les tocophérols, présents dans l'huile de noix qui doivent jouer un rôle dans la protection de cette huile.

Enfin nous avons évalué l'intérêt de rajouter ces dérivés (α et γ tocophérols) dans l'huile, pour améliorer sa protection.



I. L'huile de noix

I.1. Fabrication et production de l'huile de noix

La fabrication d'huile de noix (1) est surtout réalisée dans les huileries artisanales, quelquefois dans les huileries industrielles qui la fabriquent pendant quelques semaines et consacrent ensuite leur activité à la production d'autres huiles (arachide, tournesol, colza).

Les cerneaux sont traités de mi-décembre à fin mars. Ceux utilisés sont souvent des invalides (cerneaux refusés pour la vente directe) ou des brisures.

L'huile de noix est obtenue par pression à froid de ces cerneaux qui représentent 45 % du poids total de la noix.

- *Fabrication artisanale :*

Les cerneaux sont lentement broyés dans un moulin à huile muni d'une meule de pierre. La pâte obtenue est plus ou moins chauffée de 30 à 40 °C en Dauphiné et jusqu'à 70 °C en Périgord. Cette température de chauffage déterminera le rendement mais aussi la saveur de l'huile. La pâte chaude est alors pressée à l'aide d'une presse hydraulique. L'huile est ainsi extraite.

- *Fabrication industrielle :*

Les cerneaux sont nettoyés puis pressés. Selon les entreprises un léger chauffage est réalisé avant le pressage. En sortie de presse, la température de l'huile est comprise entre 40 et 60 °C. L'huile décante alors dans des cuves, puis est filtrée au moins trois fois dans des filtres-presses garnis de papier buvard.

Le conditionnement se fait dans des bouteilles en verre teinté. Il peut également se faire dans des bouteilles en métal revêtu intérieurement d'un vernis protecteur de qualité en raison de la fragilité des huiles vierges de première pression à froid.

Ces types d'emballage sont en effet les mieux adaptés à la protection des huiles, cette protection ayant été évaluée par mesure de la couleur de l'huile, de son indice de peroxyde et par des test sensoriels (34).

Le rendement moyen est de 50 litres pour 100 kilogrammes de cerneaux. Le résidu obtenu au fond du presseur ou tourteau est utilisé pour l'alimentation du bétail. Il est riche en protéines et sels minéraux.

I.2. Composition

Le tableau I présente la composition d'une huile de noix (9) :

- Les constituants minéraux : sodium, magnésium, calcium, phosphore, fer, cuivre et zinc sont présents à l'état de traces dans l'huile de noix.

- L'huile de noix est un aliment remarquable par sa riche teneur en lipide et, en particulier en acides gras polyinsaturés totaux et en acides gras monoinsaturés totaux.

Elle renferme cinq acides gras principaux, qui représentent plus de 99 % des acides gras totaux. Il s'agit de trois acides gras insaturés : l'acide oléique (C18:1), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linoléique (C18:3) et, de deux acides gras saturés : les acides palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0).

Sa richesse en acides gras polyinsaturés rend une huile sensible à l'oxydation, avec des risques de formation de radicaux libres, de peroxydation et de rancissement. Pour empêcher cette dégradation des matières grasses, il importe d'éviter l'action des inducteurs d'oxydation (lumière, oxygène, chaleur, catalyseurs métalliques) (2).

- Pour arrêter l'oxydation des huiles dès son premier stade (formation de radicaux libres) la présence d'antioxydants qui piègent les radicaux libres est favorable. Or l'huile de noix renferme des quantités notables de tocophérols qui sont des antioxydants naturels et peuvent donc protéger l'huile. C'est le γ -tocophérol qui est l'isomère prépondérant (499,2 mg/kg), or c'est l'isomère le plus antioxydant.

Compte-tenu de sa composition, l'huile de noix est un produit alimentaire qui peut avoir des effets bénéfiques sur la santé des consommateurs.

Tableau I : Composition de l'huile de noix

Constituants		Moyenne	
Densité		0,9	
Energie	en kcal/kg	8990,0	
	en Kj/kg	36960,0	
Eau	en g/kg	traces	
Matières sèches	en g/kg	999,0	
Protéines	en g/kg	traces	
Lipides totaux	en g/kg	999,0	
Glucides disponibles	en g/kg	0,0	
MINERAUX en mg/kg			
Sodium		traces	
Magnésium		traces	
Phosphore		traces	
Calcium		traces	
Fer		traces	
Cuivre		traces	
Zinc		traces	
ACIDES GRAS			
	en g/kg	en % d'acides gras totaux	
Ac. saturés totaux	92,7	9,7	
Ac. gras monoinsaturés totaux	170,5	17,9	
Ac. gras polyinsaturés totaux	689,5	72,2	
Ac. Myristique (C 14:0)	0,1	traces	
Ac. Palmitique (C 16:0)	69,7	7,3	
Ac. Palmitoléique (C 16:1)	1,4	0,2	
Ac. Stéarique (C 18:0)	21,0	2,2	
Ac. Oléique (C 18:1)	167,1	17,5	
Ac. Linoléique (C 18:2)	567,3	59,4	
Ac. Linoléinique (C 18:3)	122,3	12,8	
Ac. Arachidique (C 20:0)	1,0	0,1	
Ac. Eicosénoïque (C 20:1)	1,9	0,2	
Ac. Béhénique (C 22:0)	1,0	0,1	
STEROLS			
	en g/kg	en % de stérols totaux	
Stérols totaux	2,2		
Cholestérol	traces	0,2	
Bêta-Sitostérol	1,9	84,5	
Campestérol	0,1	5,5	
Stigmastérol	traces	1,0	
Brassicastérol	traces	0,2	
D7-Stigmasténol	traces	1,0	
D5-Avenasténol	0,1	5,4	
D7-Avenasténol	traces	0,3	
Ergostérol	traces	0,1	
Fucostérol	traces	0,9	
Isofucostérol	traces	1,0	
D5-Campesténol	traces	0,1	
TOCOPHEROLS			
	en mg/kg	en % de tocophérols totaux	
Tocophérols totaux	565,0		
Alpha-Tocophérol	55,7	9,9	
Bêta-Tocophérol	4,8	0,9	
Gamma-Tocophérol	499,2	88,4	
Delta-Tocophérol	5,4	1,0	

1.3. Intérêt nutritionnel

La noix est composée d'un certain nombre de constituants pouvant jouer un rôle dans la prévention des cancers et des maladies cardio-vasculaires.

En effet les résultats d'une enquête épidémiologique menée dans la région grenobloise (21) ont montré une augmentation du cholestérol HDL et des apoprotéines A1 avec une consommation régulière de noix apportées sous forme d'huile ou de cernaux.

Des études sur le rat et le lapin ont mis en évidence les effets biologiques de la noix et de son huile (29) (31) (33) (34). Elles permettent de conclure que l'huile de noix à la propriété d'abaisser le taux de cholestérol circulant, de favoriser son excrétion biliaire et de diminuer la réactivité des plaquettes. L'huile peut combattre le risque d'athérome et de thrombose, donc éviter les maladies cardiovasculaires. Ces propriétés sont dues à la nature des acides gras mais également à la teneur importante de l'huile de noix en tocophérols présentant une action antioxydante.

L'huile de noix renferme cinq acides gras principaux (§ I.2) dont trois acides gras insaturés. Or il est bien connu actuellement (2) que la consommation d'acides gras insaturés et encore mieux, d'acides polyinsaturés, considérés comme acides gras essentiels, est bénéfique dans le cadre de la prévention des maladies cardiovasculaires.

En effet ces acides gras sont hypocholestérolémiant, ils augmentent la fraction HDL-cholestérol qui est la forme d'élimination du cholestérol, encore appelée "bon cholestérol". Ils ont également des propriétés anti-aggrégantes vis à vis des plaquettes sanguines, donc empêchent la formation de caillots, pouvant entraîner thromboses et embolies.

II. Phénomène de rancissement

Le rancissement est un phénomène provoquant l'altération des aliments qui contiennent des matières grasses et est caractérisé par l'apparition de goût et d'odeur désagréables. Les huiles telle que l'huile de noix, contiennent une grande quantité de lipides insaturés, elles sont donc fortement concernées par ce phénomène. Le rancissement peut être d'origine enzymatique ou chimique (19).

II.1. Mécanisme du rancissement

L'altération des matières grasses, est provoquée

- par hydrolyse de lipides, libérant ainsi des acides gras à odeur désagréable
- par oxydation des acides gras insaturés avec formation de peroxydes, d'hydroperoxydes, puis d'acides et de composés carbonylés entraînant ainsi un goût de rance (11).

Il peut être noté qu'à cette augmentation d'hydroperoxydes, est associée une nette dégradation des tocophérols (rôle antioxydant) (32).

Ce mécanisme de rancissement (figure 1) s'effectue en trois phases: la phase d'induction, la phase de propagation et la phase d'arrêt.

- Du point de vue de la cinétique, la réaction d'auto-oxydation est caractérisée par l'existence d'une période d'induction au début de la réaction, au cours de laquelle la vitesse est pratiquement négligeable. La vitesse de la réaction croît ensuite rapidement puis se stabilise.

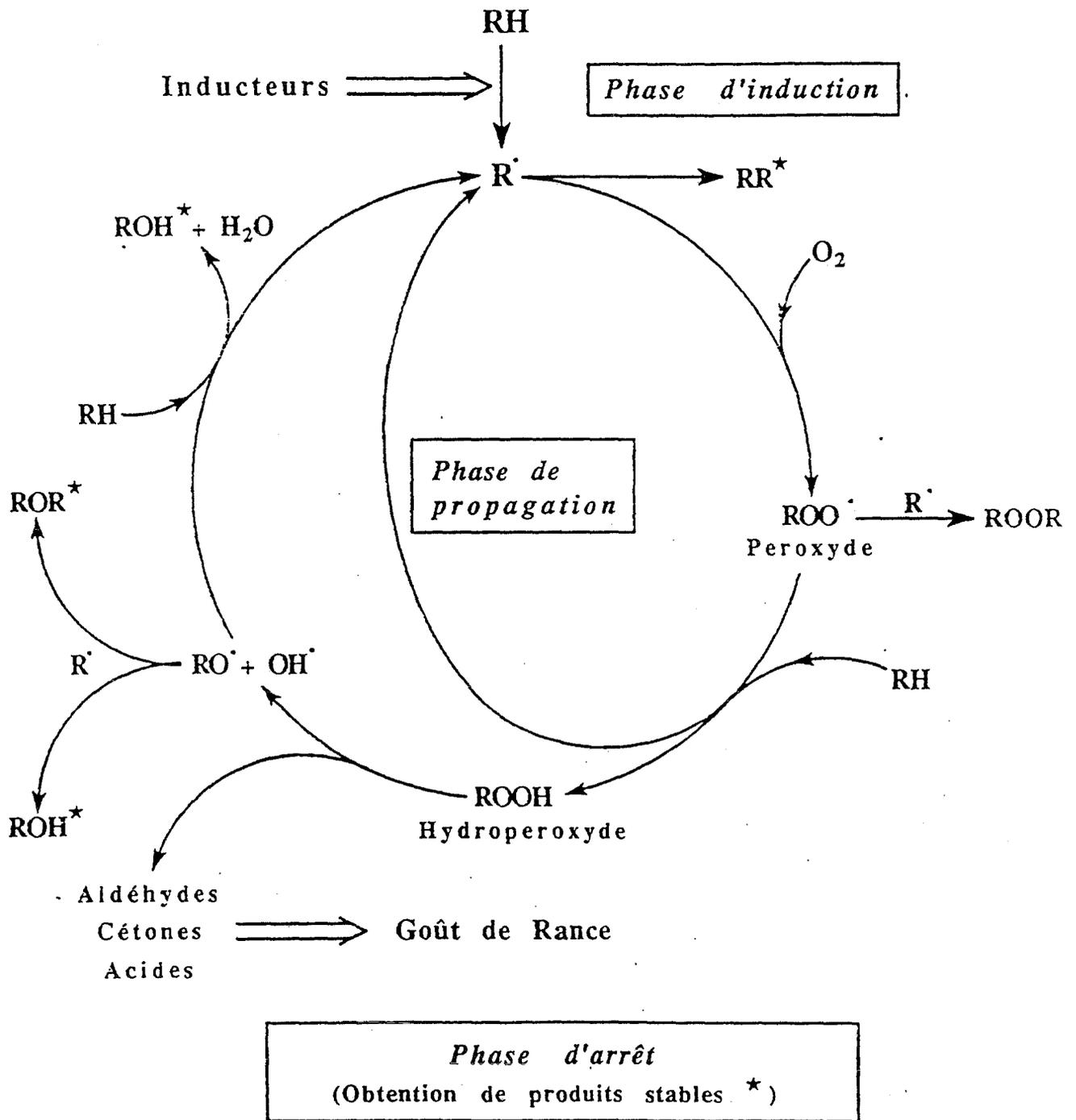
Ces faits s'accordent avec le mécanisme d'une réaction radicalaire en chaîne.

a. Phase d'induction

Si l'on représente le composé auto-oxydable par la formule R-H, la réaction de départ de la chaîne (appelée aussi réaction initiatrice) consiste en la scission homolytique de la liaison R-H avec formation de deux fragments (radicaux libres) comportant chacun un électron non couplé :



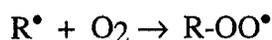
Figure 1 : Cycle de l'oxydation (11)



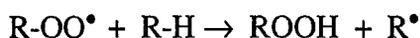
b . Phase de propagation

Dans un second temps, il y a propagation de la chaîne par suite des réactions suivantes :

Action de l'oxygène sur le radical R[•] avec formation d'un radical peroxyde :



puis réaction de ce nouveau radical avec une molécule du composé auto-oxydable R-H :



Il se forme un peroxyde et il y a régénération du radical libre R[•] qui peut à son tour amorcer une nouvelle chaîne et ainsi de suite.

c. Phase d'arrêt

La chaîne peut être interrompue par l'une des réactions de rupture suivantes :

– combinaison de deux radicaux R[•] :



– combinaison de deux radicaux peroxydes avec libération d'oxygène :



– combinaison d'un radical R[•] et d'un radical peroxyde :



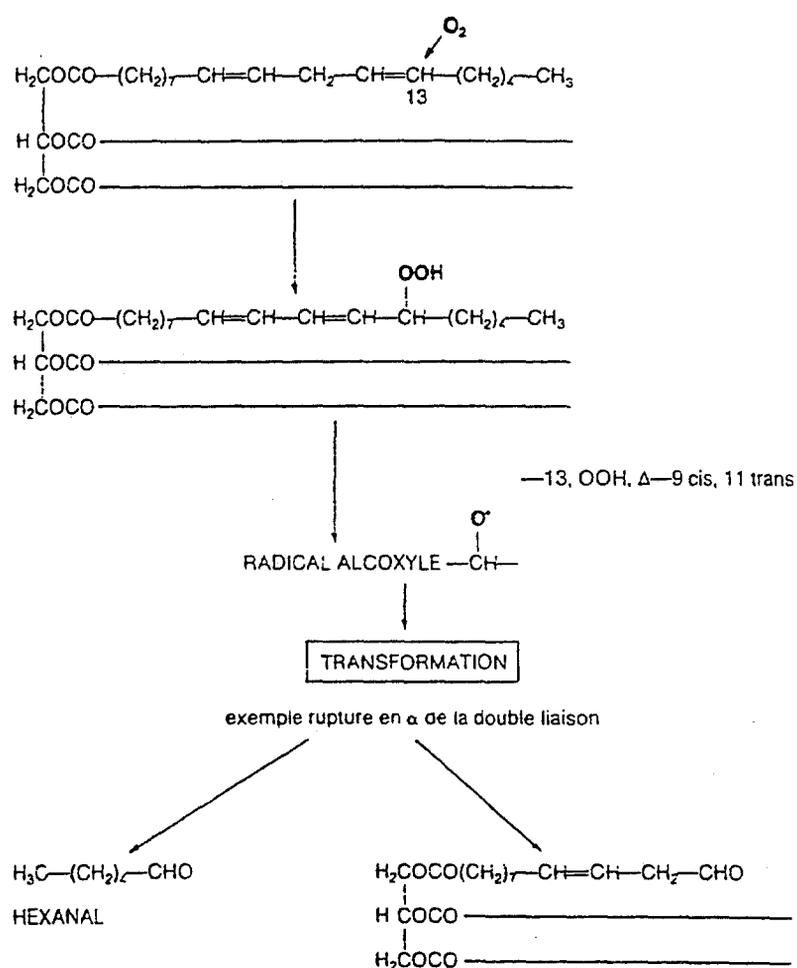
Certains peroxydes sont peu stables et se décomposent spontanément en produits oxygénés. Au cours de cette transformation, il y a création de radicaux libres qui provoquent l'amorçage de nouvelles chaînes de réactions et accroissent ainsi la vitesse de l'autoxydation.

La figure 2, (17) montre, pour exemple l'attaque oxydative au niveau de la chaîne linoléique du triglycéride. La première étape conduit à la formation du 13-hydroperoxyde-9-cis-11-trans octadiène au niveau du premier carbone porteur de la double liaison n-6. Le radical alcoyle qui en résulte subit une transformation en se rompant en α ou en β de la double liaison pour donner

- un fragment volatil, dans cet exemple, l'hexanal qui est un des constituants responsables de ce qu'il est convenu d'appeler le rancissement chimique

- un radical pouvant, par exemple, évoluer vers une forme aldéhydique à douze atomes de carbone qui présente la particularité de rester liée au triglycéride qui voit son poids moléculaire diminuer de façon très nette.

Figure 2 : Formation et transformation des hydroperoxydes (17)



II.2. Facteurs initiateurs du phénomène de rancissement

Ce phénomène de rancissement peut s'effectuer sous l'influence de divers facteurs initiateurs tels que l'oxygène, la lumière, la température, les métaux (17) ainsi que des enzymes. Les graisses sous l'influence de ces facteurs développeront une scission homolytique de la liaison R-H.

Ces catalyseurs d'oxydation sont :

- *L'oxygène* qui amorce le phénomène d'oxydation. Il est présent soit sous forme dissoute dans la matière grasse, soit emprisonné dans l'espace situé au dessus de l'huile lorsque le récipient est partiellement rempli.

- *La lumière* et plus précisément le rayonnement ultraviolet de courte longueur d'onde, qui favorise le phénomène d'oxydation. L'absorption d'énergie lumineuse facilite la rupture de la liaison R-H. La lumière ($h\nu$) est un initiateur de réaction radicalaire.

- *Les traces métalliques* (fer cobalt, cuivre manganèse, plomb) et *la température* sont des catalyseurs d'oxydation.

En tenant compte de ces divers paramètres essentiels, ainsi que de la présence d'antioxydants naturels tels que les tocophérols (§ III.6), nous allons évaluer la variation de la qualité d'une huile de noix au cours de sa conservation.

III. Mise en évidence de l'évolution d'une huile de noix en fonction des conditions de stockage

L'évolution de la dégradation des acides gras (18) peut être évaluée à l'aide de divers critères chimiques représentatifs : l'indice d'acide, l'indice de peroxyde, l'indice de carbonyle et la présence d'hydrocarbures de faible poids moléculaire. Cette étude a été effectuée aux temps : $t = 0, 1, 3$ et 12 mois en tenant compte de différentes conditions de conservation.

III.1. Echantillonnage et stockage (10)

L'huile de noix choisie a été fournie par monsieur R. Ville, producteur (38430 MOIRANS), et a été préparée par pression à basse température.

Après ouverture des bouteilles, l'huile a été répartie dans des flacons en verre de 250 ml à bouchon en plastique. Certains ont été remplis entièrement, à 100%, pour éviter d'emprisonner de l'oxygène dans l'espace vide supérieur et ne seront analysés qu'au bout d'un an. D'autres n'ont été remplis qu'à 75% pour simuler une utilisation domestique. Les deux catégories sont ensuite conservées dans les conditions décrites dans le tableau II.

Tableau II :
Echantillonnage et stockage :

Conditions de stockage		Nombre de flacons
<i>Exposition à la lumière:</i>		
Température	Humidité relative	
25°C	60%	2 flacons remplis à 75% 1 flacon rempli à 100%
<i>A l'obscurité :</i>		
Température	Humidité relative	
4°C	60%	2 flacons remplis à 75% 1 flacon rempli à 100%
30°C	60%	2 flacons remplis à 75% 1 flacon rempli à 100%
40°C	75%	2 flacons remplis à 75% 1 flacon rempli à 100%
25°C	60%	2 flacons remplis à 75% 1 flacon rempli à 100%

Remarque: Les trois paramètres à déterminer (dosage des peroxydes, indices d'acide et de carbonyle) sur chacun des échantillons ne pouvant techniquement pas être réalisés en une seule journée, les échantillons sont placés à 4°C pendant le temps de cette détermination afin que les résultats obtenus traduisent au mieux ceux des différents temps fixés.

III.2. Détermination de l'indice d'acide:

III.2.1. Différentes méthodes de dosage:

La littérature mentionne plusieurs méthodes pour la détermination de l'indice d'acide (37) :

- *Une méthode titrimétrique* qui consiste, dans un premier temps à dissoudre à chaud le corps gras dans de l'éthanol préalablement neutralisé, puis dans un deuxième temps à titrer l'acidité libre du mélange par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

- *Une méthode potentiométrique:* le potentiomètre utilisé est muni d'électrodes de verre et au calomel à plonger dans l'échantillon préalablement préparé. Une solution d'hydroxyde de potassium est ajoutée jusqu'au point d'équivalence.

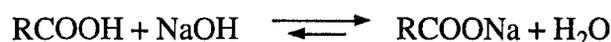
La méthode potentiométrique est plus particulièrement destinée aux corps gras bruts de couleur foncée en raison de la difficulté de détermination du point équivalent par la méthode titrimétrique.

Nous avons choisi la méthode titrimétrique puisque sur l'huile de noix le virage de l'indicateur est bien visible (absence de coloration pouvant masquer le virage).

III.2.2. Définition et principe de la méthode

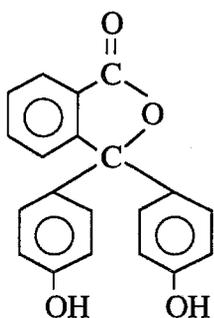
L'indice d'acide d'un corps gras est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser l'acidité libre, d'un gramme de ce corps gras.

La prise d'essai d'huile de noix est dissoute à chaud dans de l'éthanol préalablement neutralisé. Le mélange est alors titré par une solution d'hydroxyde de sodium.

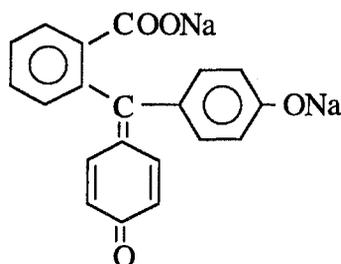


L'indicateur coloré choisi est la phénolphtaléine, qui en milieu neutre ou acide, sous sa forme lactonique, est incolore alors qu'en milieu alcalin (pH 8,2-10), sous sa forme quinonique, présente une coloration rose.

Phénolphtaléine sous formes lactonique et quinonique :



Forme lactonique



Forme quinonique

III.2.3. Mode opératoire et expression des résultats:

Deux types d'études ont été conduites. La première est réalisée sur les flacons d'huile remplis à 75 % et permet la comparaison de ces échantillons stockés à diverses températures (4°C, 25°C, 30°C, 40°C), puis soumis ou non à la lumière à 25°C. La deuxième est effectuée sur deux types de flacon dont l'un est rempli à 100 % et l'autre à 75 %, après 12 mois de stockage et aux différentes températures.

Une prise d'essai d'une masse voisine de 6 grammes d'huile de noix, pesée avec précision à 0,001 gramme près, est introduite dans une fiole conique de 250 ml. Au corps gras est ajouté environ 100 ml d'éthanol à 96% portés avec précaution au voisinage de l'ébullition afin de faciliter la dissolution. L'alcool aura été au préalable neutralisé par de l'hydroxyde de sodium 0,1N en présence de phénolphtaléine.

La solution ainsi obtenue est titrée par de l'hydroxyde de sodium 0,1N en présence de phénolphtaléine jusqu'à persistance de la coloration rose pendant au moins quinze secondes.

Deux déterminations ont été effectuées sur le même échantillon d'huile.

Sachant que la masse molaire de l'hydroxyde de potassium est $M= 56$, l'indice d'acide exprimé en milligramme de KOH par gramme de produit est égal à :

$$= \frac{nNf \times 56}{P}$$

- Où
- n est le volume en ml de la solution titrante de KOH
 - N est la normalité de la solution titrante
 - f est le facteur de correction de la solution titrante
 - P est la masse en gramme de la prise d'essai

Tableau III

Evolution de l'indice d'acide déterminé** par la méthode titrimétrique en fonction des conditions et de la durée du stockage :*

Conditions de stockage		0 mois	1 mois	3 mois	12 mois
<i>Exposition à la lumière:</i>					
Température 25°C	Humidité relative 60%	0,87	0,98	1,03	1,27
<i>A l'obscurité :</i>					
Température 4°C	Humidité relative 60%	0,87	0,98	1,00	1,03
25°C	60%	0,87	0,93	1,00	1,05
30°C	60%	0,87	0,98	1,09	1,13
40°C	75%	0,87	1,00	1,24	1,30

* L'indice d'acide est exprimé en mg de KOH/g de produit

** Sur des flacons remplis à 75 %

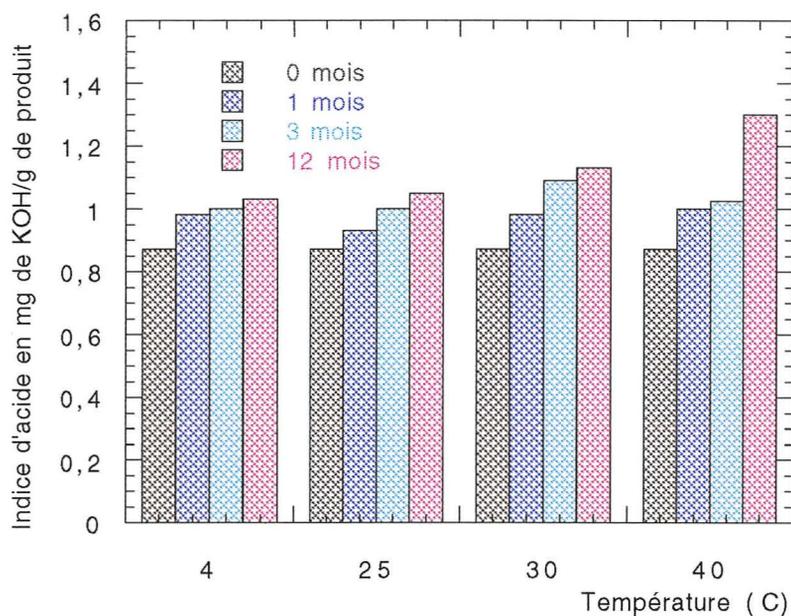
III.2.4. Résultats et interprétations:

• Les indices d'acides en fonction des conditions (température, lumière) et de la durée du stockage obtenus sont réunis dans le tableau III.

Ces résultats ont permis de montrer:

-*l'effet de la température:* La figure 3 montre que lorsque la température augmente, l'indice d'acide augmente. Cette augmentation n'est cependant pas très importante.

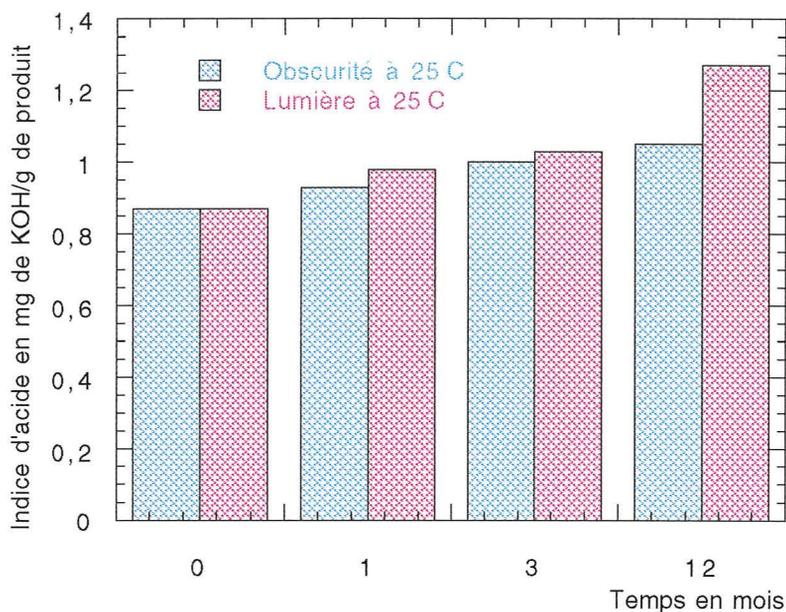
Figure 3 : Comparaison de l'huile de noix stockée à l'obscurité à différentes températures



Ainsi plus la température de stockage est élevée, plus l'acidité de l'huile est importante.

-l'effet de la lumière: La figure 4 nous montre pour une même température, 25 C, l'effet de la lumière sur l'acidité libre de l'huile. Il est bien mis en évidence une augmentation de cette acidité pour l'échantillon stocké à la lumière quelle que soit la période où les analyses ont été réalisées.

Figure 4 : Comparaison de l'huile de noix stockée à la lumière et à l'obscurité

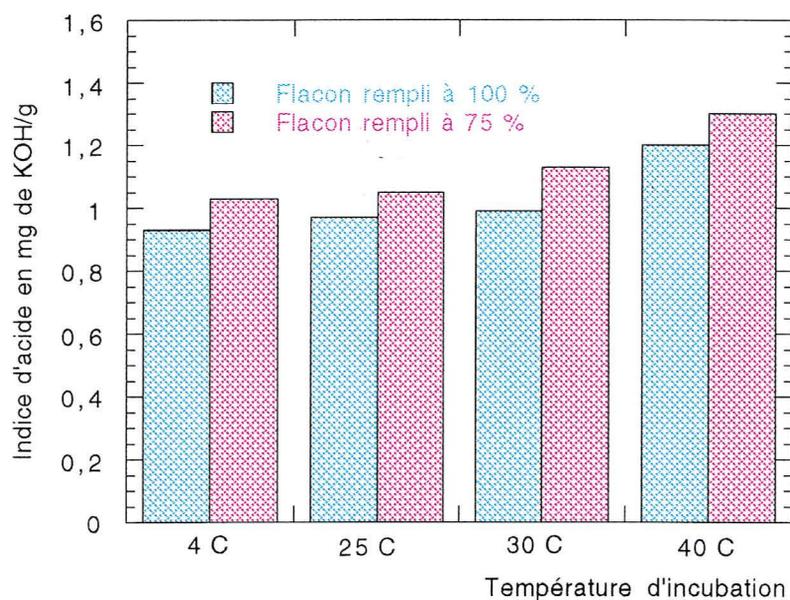


La lumière semble accélérer le processus de dégradation de l'huile de noix.

-l'effet du temps: Comme nous le montrent les figures 3 et 4 quel que soit le mode de stockage considéré, une nette augmentation de l'acidité libre de l'huile est observée au cours du temps.

Les essais réalisés sur les flacons remplis à 100% et à 75% ont pour but de mettre en évidence l'effet de l'oxygène sur la dégradation des acides gras de l'huile. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 5.

Figure 5 : Influence de l'oxygène sur le rancissement d'une huile de noix



Cet histogramme montre que quelle soit la température de stockage, la présence d'oxygène de l'air à la surface de l'huile (flacon rempli à 75 %) entraîne une augmentation de l'indice d'acide.

III.2.5. Conclusion

Cette étude montre l'accroissement de l'indice d'acide en fonction de la température ainsi que de la durée de stockage. Cette acidité est d'autant plus importante que l'huile a été placée à la lumière et que l'on se trouve en présence d'oxygène.

III.3. Détermination de l'indice de carbonyle :

III.3.1. Différentes méthodes de dosage

La littérature mentionne plusieurs techniques pour le dosage des carbonyles :

- Une méthode colorimétrique utilisant la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) permet grâce à la formation de dinitrophénylhydrazone d'estimer la teneur en carbonyle dans les huiles contenant des hydroperoxydes. Ces derniers seront réduits par la triphénylphosphine car ils peuvent se décomposer en carbonylés, modifiant la véritable estimation des carbonyles (8) présents dans l'huile.

- Une méthode titrimétrique basée sur l'utilisation du chlorhydrate d'hydroxylamine qui conduira à une oxime après réaction d'addition nucléophile puis d'élimination. L'acidité formée est alors dosée par retour (37).

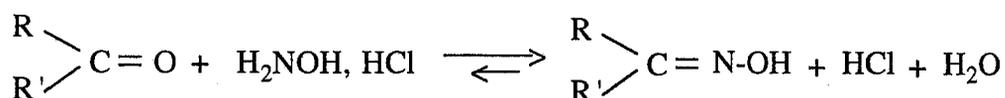
- Une méthode chromatographique, HPLC, utilisant la DNPH pour la détermination de composés carbonylés (28).

III.3.2. Méthode titrimétrique

a. Définition et principe de la méthode titrimétrique (37):

L'indice de carbonyle est le nombre de milligrammes de groupement carbonyle par gramme de corps gras.

La méthode est basée sur le fait que les groupements carbonyles réagissent sur le chlorhydrate d'hydroxylamine en donnant une oxime avec libération d'une molécule d'acide chlorhydrique :



Il s'agit d'un dosage par retour : une base, KOH, est apportée en excès, afin de neutraliser l'acidité formée. La potasse qui n'a pas réagi est alors titrée par une solution d'acide chlorhydrique en présence de bleu de bromophénol (zone de virage entre pH 3,0 et 4,6).

Cet indicateur de pH de couleur jaune en milieu acide devient coloré en bleu en milieu basique.

b. Mode opératoire :

Dans un ballon rodé sont pesés avec précision 2 g d'huile de noix auxquels sont ajoutés 2 ml d'hexane et 2 ml d'éthanol absolu; cela afin de permettre une bonne dissolution de l'huile.

Un volume de 25 ml, exactement mesurés, de solution alcoolique de chlorhydrate d'hydroxylamine à 5%, est apporté. Puis, 20 ml, exactement mesurés, de solution de potasse alcoolique 0,5 N sont ajoutés au mélange. Le ballon est alors adapté à un réfrigérant et le mélange est porté à douce ébullition pendant 3 heures. Après refroidissement, quelques gouttes de solution de bleu de bromophénol sont ajoutées afin de permettre le titrage de l'excès de potasse par de l'acide chlorhydrique 0,5 N.

Un blanc est réalisé dans les mêmes conditions.

Il est mentionné que les peroxydes donnent avec le chlorhydrate d'hydroxylamine un alcool avec libération d'azote. Il se forme alors deux molécules d'acide chlorhydrique aboutissant à une fausse mesure des composés carbonylés. Pour empêcher ce phénomène, les peroxydes de l'huile de noix doivent être détruits. Pour cela les échantillons sont chauffés au bain marie à 130°C sous azote pendant 20 minutes.

Cette *méthode titrimétrique* a dû être modifiée car dans sa zone de virage l'indicateur passant d'une coloration jaune-verte à une coloration bleu-verte est très difficilement perceptible à l'oeil nu.

Nous avons alors essayé de mettre en évidence le point d'équivalence par une *méthode potentiométrique*.

III.3.3. Modification de la méthode par utilisation d'un potentiomètre :

La potentiométrie est une méthode électrochimique d'analyse pour laquelle l'intensité du courant est fixe et le potentiel varie en fonction de la concentration en acide de l'échantillon. Elle fait intervenir deux électrodes et repose sur les échanges de protons entre l'électrode de verre et la solution qui la baigne.

Pour suivre le titrage, les électrodes utilisées sont

- *l'électrode de mesure*, électrode de verre au niveau de laquelle il y a échange de protons entre le verre hydraté et ceux de la solution. Elle doit être hydratée avant sa mise en service.

- *l'électrode de référence*, électrode au calomel saturé, $\text{Hg}^\circ/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$ saturé.

Après titrage une courbe acide-base ($\text{pH} = f(\text{Volume de solution titrante})$) est tracée à partir de laquelle le point d'équivalence est mis en évidence.

Les essais sur l'huile de noix a donné des résultats très fluctuants. Ainsi, afin d'essayer de valider cette méthode, une quantité connue avec précision, de méthylisobutylcétone a été dosée en suivant le protocole.

L'indice de carbonyle obtenu par calcul est de :

278,65 mg de CO / g de produit.

Les valeurs de l'indice de carbonyle obtenues en pratique, le même jour et sur une même prise d'essai, nous ont donné des résultats non cohérents :

1239,9 mg de CO /g et 1363,7 mg de CO /g de produit.

D'un jour à l'autre, les résultats différaient encore plus :

893,2 mg de CO /g de produit.

Devant la dispersion des résultats nous avons mis en cause l'éthanol qui peut renfermer des dérivés carbonylés, comme notamment l'éthanal. Un essai conduit sur l'éthanol, sans prise d'essai, a donné un résultat positif.

Du fait de cette constatation, toutes les déterminations ultérieures d'indice de carbonyle faites au laboratoire ont été réalisées en utilisant de l'éthanol très pur et repurifié avant son emploi. Un traitement par un sel de plomb en milieu alcalin permet d'éliminer les dérivés carbonylés.

Tous les réactifs ont été préparés avec cet éthanol purifié et leurs volumes ont été en outre mesurés avec précision. Un témoin a été d'autre part réalisé en parallèle pour corriger les effets des traces de dérivés carbonylés qui peuvent rester dans le solvant.

Néanmoins, ce dosage n'est pas très reproductible. Le dosage des carbonyles de l'huile sera effectué dans l'avenir par une technique colorimétrique.

III.3.4. Conclusion

La méthode titrimétrique proprement dite ne peut être utilisée du fait de la difficulté de perception de la zone de virage, aussi nous avons amélioré la détermination du point équivalent par potentiométrie.

Cependant, des différences importantes sont observées d'un jour à l'autre et au cours d'une même série d'analyse. Ces écarts pourraient être attribués à la présence de dérivés carbonylés dans l'éthanol.

III.4. Dosage des peroxydes

Les peroxydes, premiers maillons de la chaîne oxydative des acides gras, vont être étudiés et dosés par différentes méthodes analytiques.

III.4.1. Différentes méthodes de dosage:

La littérature mentionne plusieurs techniques pour le dosage des peroxydes dans les graisses.

- *Une méthode titrimétrique : iodométrique* qui permet la détermination de l'indice de peroxyde des corps gras (27) .

- *Une méthode spectrophotométrique* permettant de mesurer les peroxydes dans les lipides alimentaires grâce à l'oxydation de fer ferreux en présence de xylénol orange: c'est la méthode FOX (Ferrous Oxidation Xylenol Orange) (22) (36).

- *Des méthodes électrochimiques : la coulométrie*, où l'iode, formé lors de l'oxydation d'un iodure par les peroxydes de l'échantillon, est électrochimiquement réduit au niveau de l'électrode. Cette technique permet de connaître les valeurs en peroxydes dans les huiles comestibles et les graisses (25).

l'ampérométrie où un réactif intermédiaire, l'acide ferrocène monocarboxylique est utilisé. Il s'oxyde au contact des peroxydes puis se réduit à l'électrode de travail donnant un signal électrique (24).

- *Une méthode chromatographique : la Chromatographie Liquide Haute Performance avec une détection par chimio-luminescence*, qui permet d'identifier et doser les hydroperoxydes lipidiques dans les tissus et fluides biologiques (38).

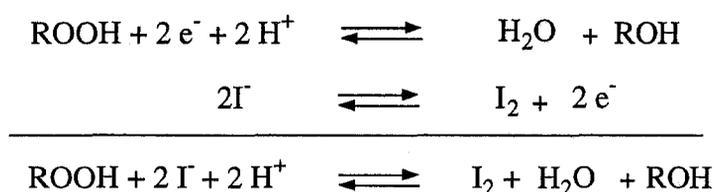
Pour nos déterminations, nous avons retenu trois méthodes : titrimétrique, spectrophotométrique et ampérométrie. La première correspond à la méthode officielle qui pourra être comparée aux deux autres.

III.4.2. Méthode titrimétrique: indice de peroxyde

a. Définition et principe de la méthode (27) :

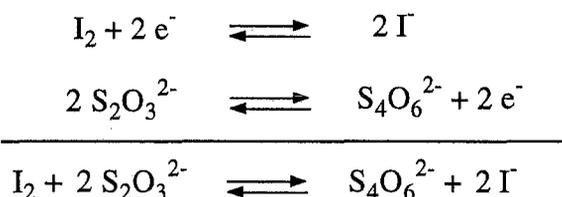
L'indice de peroxyde d'un corps gras est défini comme le nombre de milliéquivalents d'oxygène actif contenu dans 1000 grammes de substance.

La méthode est basée sur la propriété des peroxydes de pouvoir oxyder l'iodure de potassium en iode:



Un milieu acide est nécessaire afin d'être en présence du couple oxydo/réducteur I^0/I^- .

L'iode libéré est alors titré par une solution de thiosulfate de sodium. Il s'agit d'un dosage par retour.



L'indicateur choisi est l'empois d'amidon car il a la propriété d'adsorber l'iode en donnant une coloration bleue et de redevenir incolore après la disparition de l'halogène.

b. Mode opératoire:

Dans une nacelle en verre on pèse avec précision une masse d'huile voisine de 2 g. La quantité de prise d'essai en gramme est choisie en fonction de l'indice de peroxyde présumé.

La nacelle est introduite dans un flacon de 250 ml muni d'un bouchon de verre puis, sont ajoutés 10 ml de dichlorométhane. L'huile est alors rapidement dissoute par

agitation. Après avoir ajouté 15 ml d'acide acétique cristallisable, puis 1 ml de solution saturée d'iodure de potassium, le flacon est aussitôt bouché, puis agité pendant 1 minute. Ce dernier est alors abandonné pendant 5 minutes à l'abri de la lumière afin que la réaction ait lieu. 75 ml d'eau distillée sont alors ajoutés.

L'iode libéré est alors titré, en présence d'empois d'amidon, par une solution de thiosulfate de sodium 0,01 N.

Deux déterminations ont été effectuées sur le même échantillon d'huile.

c. Expression des résultats:

L'indice de peroxyde peut être exprimé de deux façons:

- en microgramme d'oxygène actif par gramme de produit:

$$= \frac{nNf \times 8 \times 10^3}{P}$$

- en milli-équivalent d'oxygène actif pour 1000 grammes de produit:

$$= \frac{nNf \times 1000}{P}$$

où n est la quantité de thiosulfate de sodium en ml
N est la normalité de la solution de thiosulfate de sodium
f est le facteur de correction de la solution titrante
P est la masse en gramme de la prise d'essai

Nous avons choisi d'exprimer l'indice de peroxyde en mEq d'O₂/1000 g de produit.

d. Résultats et interprétation:

L'évolution de l'indice de peroxyde, déterminée par méthode titrimétrique, a été évaluée en fonction des conditions et de la durée du stockage. Les résultats sont réunis dans le tableau IV.

Ces résultats ont permis de montrer:

-*l'effet de la température:* La figure 6 montre que lorsque la température augmente, l'indice de peroxyde augmente. Cette augmentation est d'autant plus importante vers les hautes températures.

Figure 6 : Comparaison de l'huile de noix stockée à l'obscurité à différentes températures

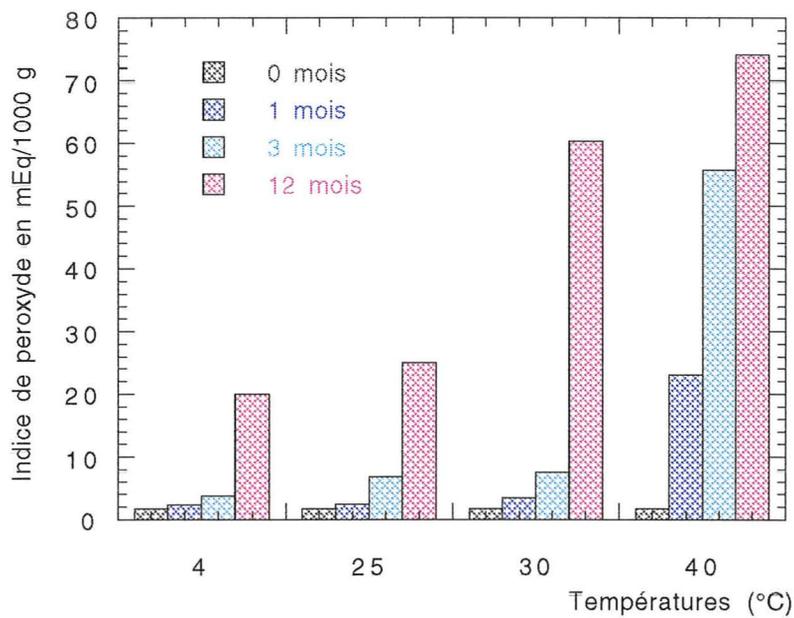


Tableau IV

Evolution de l'indice de peroxyde déterminé** par la méthode titrimétrique en fonction des conditions et de la durée du stockage :*

Conditions de stockage		0 mois	1 mois	3 mois	12 mois
<i>Exposition à la lumière:</i>					
Température 25°C	Humidité relative 60%	1,7	20	15	39,5
<i>A l'obscurité :</i>					
Température 4°C	Humidité relative 60%	1,7	2,3	3,8	20
25°C	60%	1,7	2,5	6,8	25
30°C	60%	1,7	3,4	7,6	60,3
40°C	75%	1,7	23,1	55,8	74,2

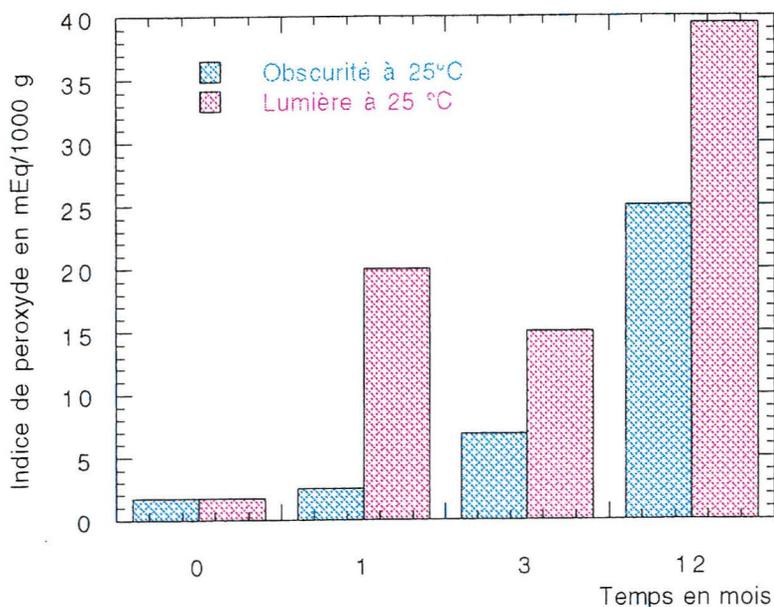
* L'indice de peroxyde s'exprime en mEq d'O₂/1000 g de produit.

** Sur des flacons remplis à 75 %

-l'effet de la lumière: La figure 7 nous montre pour une même température, 25°C, l'effet de la lumière sur l'augmentation du taux de peroxyde.

Il est mis en évidence une augmentation du taux de peroxyde bien plus importante pour l'échantillon stocké à la lumière que pour celui stockée à l'obscurité.

Figure 7 : Comparaison de l'huile de noix stockée à la lumière et à l'obscurité



Il faut cependant noter que pour l'échantillon stocké à la lumière, le dosage effectué après 3 mois de stockage donne un résultat inférieur au dosage effectué après 1 mois.

Cette baisse entre 1 mois et 3 mois pourrait s'expliquer par la différence de volume d'oxygène présent dans le flacon de l'échantillon. En effet, lors du dosage au bout d'1 mois la faible quantité d'huile présente au fond du flacon a été en contact avec un plus grand volume d'oxygène, puisque que pour le dosage effectué au bout de 3 mois, le flacon utilisé été rempli à 75% .

Il est également possible que les peroxydes formés dans un premier temps poursuivent leur dégradation en acide, aldéhyde ou cétone.

-l'effet du temps: Les figures 6 et 7 montrent que, quel que soit le mode de stockage considéré, une nette augmentation du taux de peroxyde est observée au cours du temps.

III.4.3. Méthode spectrophotométrique FOX (14) (15)

a. Principe de la méthode:

La méthode est basée sur la propriété des peroxydes d'oxyder le fer ferreux en fer ferrique, en milieu acide. Le xylénol orange, sel de sodium de l'O-crésolsulfonephthaléine-3',3"-bis (méthyliminodiacétique), est utilisé comme indicateur de présence des ions ferriques avec lesquels il forme un complexe orangé absorbant dans le visible à 560 nm.

Le fer ferreux est apporté sous forme de sulfate de fer (II) et d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Fe}(\text{SO}_4)$, $6\text{H}_2\text{O}$, et le milieu acide par de l'acide sulfurique.

Du butylhydroxytoluène (BHT), antioxydant liposoluble, est ajouté au réactif afin d'empêcher une peroxydation des lipides pendant l'essai même.

b. Mode opératoire:

Les échantillons ont été préparés en dissolvant environ 100 mg d'huile de noix pesés avec précision dans 10 ml de propan-1-ol afin d'avoir une meilleure miscibilité entre la prise d'essai et le réactif, l'huile n'étant pas soluble dans le méthanol du réactif.

Le réactif, appelé FOX (Ferrous Oxidation Xylenol orange), a été préparé par dissolution du xylénol orange et du sulfate ferreux ammoniacal dans l'acide sulfurique (250 mM) afin d'obtenir des concentrations respectives de 1 et de 2,5 mM. Un volume de cette solution concentrée est ajouté à 9 volumes d'une solution méthanolique contenant 4,4 mM de BHT. De cette manière, le réactif a une concentration finale de :

- 250 μM de sulfate ferreux et d'ammonium
- 100 μM de xylénol orange
- 25 mM d'acide sulfurique
- 4 mM de BHT

dans le mélange méthanol / propanol (90:10) (v/v).

Un volume exactement mesuré de 9 ml du réactif FOX est ajouté à une prise d'essai exacte de 2 ml de solution propanolique d'huile dans des tubes en polycarbonate de 25 ml. L'ensemble est mélangé au vortex puis incubé pendant 30 minutes dans une étuve à 25°C.

Le tube est centrifugé à 12000 g pendant 5 minutes afin d'éliminer les micelles. Le surnageant est alors prélevé avec précaution, puis son absorbance est mesurée à 560 nm.

Avant chaque série de dosage, une courbe d'étalonnage a été réalisée afin de connaître la correspondance entre l'absorbance et la quantité de peroxyde détectée dans l'échantillon.

Pour cela nous avons utilisé une solution mère de peroxyde d'hydrogène à 30% que nous avons diluée à l'aide d'eau distillée jusqu'à obtenir une solution de 176,4 $\mu\text{mol/l}$ de peroxyde d'hydrogène à partir de laquelle la gamme d'étalonnage suivante a été établie (Tableau V).

Tableau V : Gamme d'étalonnage

H ₂ O ₂ (μl)	10	20	40	60	80	100
Eau distillée (μl)	90	80	60	40	20	0
Réactif FOX (μl)	900	900	900	900	900	900
Concentration en H ₂ O ₂ ($\mu\text{mol/l}$)	2	4	8	12	16	20

Remarque: Les concentrations en H₂O₂ du tableau correspondent à des valeurs obtenues directement par calcul, en considérant le titre de la solution mère égal à exactement 30%.

En pratique, la solution mère a été étalonnée par manganimétrie afin de connaître avec précision sa concentration et d'avoir la meilleure corrélation possible entre l'absorbance et la concentration en peroxyde.

Un courbe d'étalonnage a été tracée avant chaque série de dosages (1 mois, 3 mois).

c. Expression des résultats:

A partir de la courbe d'étalonnage et grâce aux absorbances obtenues à 560 nm, les résultats sont directement obtenus en $\mu\text{mol/l}$. Cependant il est plus intéressant d'étudier les résultats en mEq d'oxygène pour 1000 grammes de produit afin de permettre une comparaison aisée de la méthode spectrophotométrique FOX avec la méthode titrimétrique réalisée précédemment ce qui a été fait en tenant compte de la densité de l'huile et des dilutions.

d. Résultats et interprétation:

L'évolution du taux de peroxyde, déterminé par la méthode spectrophotométrique, est présentée dans le tableau VI.

Les résultats ont permis de montrer :

-l'effet de la température: La figure 8 montre que lorsque la température augmente, le taux de peroxyde augmente. Cette augmentation est d'autant plus importante que les températures sont hautes. Ceci rejoint les résultats obtenus par la méthode précédente.

Figure 8 : Comparaison de l'huile de noix stockée à l'obscurité à différentes températures

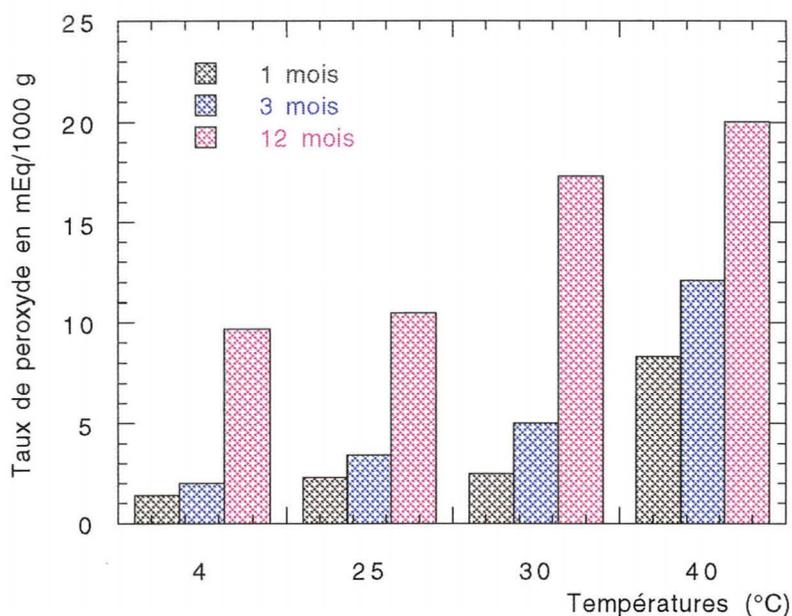


Tableau VI

Evolution du taux de peroxyde déterminé** par la méthode spectrophotométrique en fonction des conditions et de la durée du stockage:*

Conditions de stockage		1 mois	3 mois	12 mois
<i>Exposition à la lumière:</i>				
Température 25°C	Humidité relative 60%	7,9	9,0	12,3
<i>A l'obscurité :</i>				
Température 4°C	Humidité relative 60%	1,4	2,0	9,7
25°C	60%	2,3	3,4	10,5
30°C	60%	2,5	5,0	17,3
40°C	75%	8,3	12,1	20,0

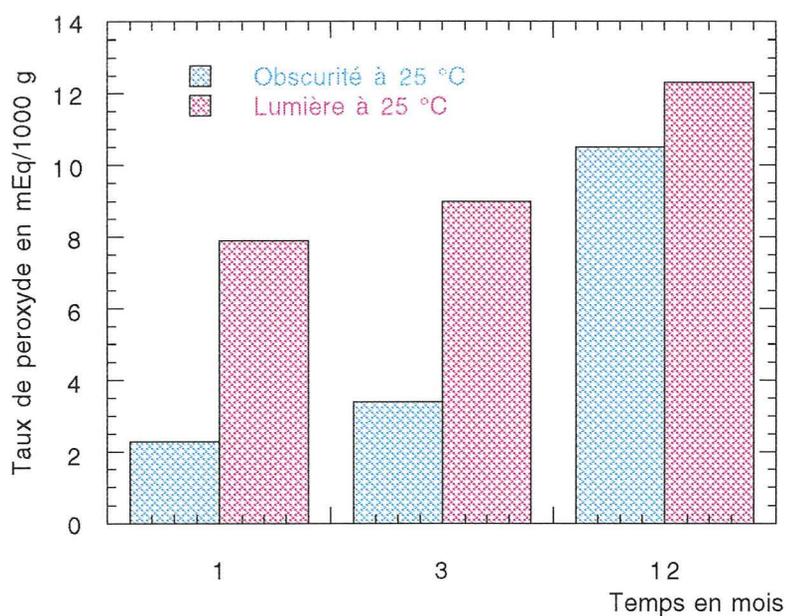
* Exprimé en mEq d'O₂/1000 g de produit

** Sur des flacons remplis à 75 %

-l'effet de la lumière: La figure 9 nous montre pour une même température, 25°C, l'effet de la lumière sur l'augmentation du taux de peroxyde.

Il est bien mis en évidence une augmentation du taux de peroxyde pour l'échantillon stocké à la lumière.

Figure 9 : Comparaison de l'huile de noix stockée à la lumière et à l'obscurité



l'effet du temps : D'après les graphes 8 et 9, quel que soit le mode de stockage considéré, une nette augmentation du taux de peroxyde est observée au cours du temps.

III.4.4. Méthode ampérométrique

Ce travail concerne la détection au cours du temps des peroxydes formés au cours du phénomène d'oxydation des acides gras. En vue de cette détection, une technique de dosage par ampérométrie a été choisie (24) du fait de sa grande sensibilité. En effet la limite de détection est de 20 nM pour l'acide linoléique peroxydé et de 25 nM pour l'acide linoléique peroxydé.

III.4.4.1. Matériel

Lors de cette étude, nous avons utilisé un polarographe impulsionnel (de type PRG5 provenant de chez Tacussel France), tenant lieu d'ampéromètre tout au long de nos essais.

L'appareillage comporte une cellule (ou cuve) en verre teinté munie d'un couvercle s'adaptant hermétiquement et possédant cinq rodages.

Cette cellule à double paroi est thermostatée par un ultra thermostat (de type RTP Pol de chez Tacussel) pour obtenir une température de 25 °C avec une précision de $\pm 0,1^\circ\text{C}$, durant toute la durée des essais. Cette précision est nécessitée par le fait que le courant de diffusion ne doit être perturbé ni par convection ni par agitation thermique. Le couvercle, en verre teinté afin de protéger la solution à étudier de la photodécomposition, comporte cinq rodages sur lesquels se fixent trois électrodes, un thermomètre de précision, ainsi qu'un système de dégazage de la solution qui pourra, si nécessaire, permettre un barbotage d'azote par exemple. La solution à étudier (10 ml) est introduite dans la cellule.

Les trois électrodes utilisées dans le montage sont les suivantes :

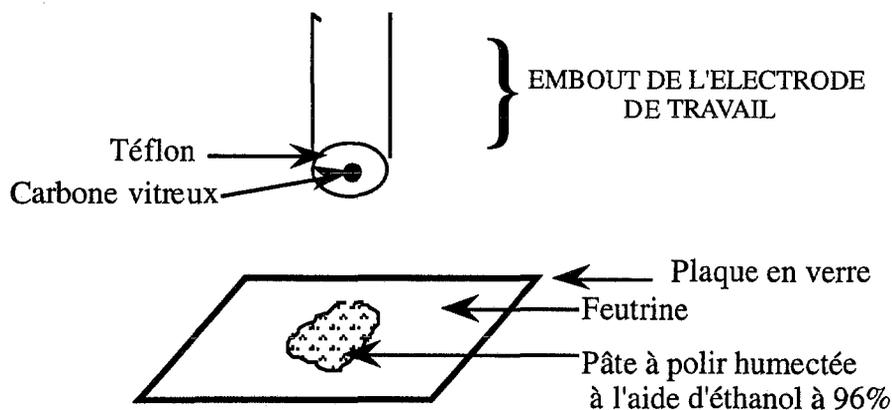
a. une électrode de référence (E_R) au calomel saturé, E.C.S. : $\text{Hg}^\circ/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$ saturé, munie d'une allonge de protection s'adaptant au couvercle de la cellule par l'intermédiaire d'un rodage. Cette électrode impolarisable n'étant pas parcourue par le courant, aura un potentiel fixe dans le temps.

b. une électrode de travail (ET) c'est une électrode solide tournante de type EDI de chez Tacussel.

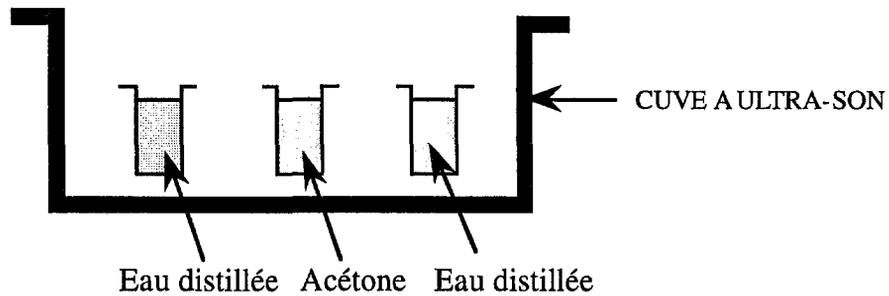
Elle sera utilisée dans nos essais, soit en position tournante (2500 tours/minute) soit en position stationnaire.

L'embout interchangeable qui la constitue est en carbone vitreux pyrolytique japonais (3 mm de diamètre). Il devra obligatoirement être poli entre chaque essai afin d'enlever le dépôt qui se forme au cours de la réaction électrochimique. En effet, au niveau de l'électrode de travail, le complexe ferrique ($[\text{Fe}] \text{cp}^+$) préalablement formé (§ III.4.4.2) sera réduit en complexe ferreux qui se déposera sur le carbone vitreux. Pour avoir des résultats reproductibles, le carbone vitreux devra posséder le même état de surface pour chaque essai.

Pour polir cet embout d'une façon reproductible une pâte à polir humectée à l'aide d'éthanol à 96% est utilisée. Cette pâte est déposée sur une feutrine fixée sur une plaque de verre parfaitement plane. Le polissage est alors soigneusement effectué par rotation manuel de l'embout.



Après cette étape, une sonication de l'embout est nécessaire, afin d'éliminer la pâte à polir qui reste incrustée dans les pores du carbone vitreux. La sonication est réalisée dans trois solvants successifs, eau distillée, acétone, puis à nouveau eau distillée, placés dans trois béchers qui sont installés dans la cuve à ultra-sons. Les deux premiers solvants servent à éliminer la poudre à polir, le dernier béccher contenant de l'eau distillée est utilisé pour le rinçage final.

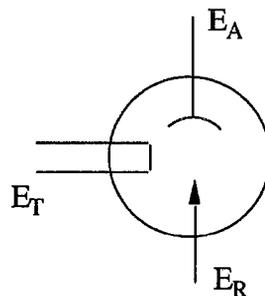


c. une électrode auxiliaire (E_A)

Le passage du courant dans le circuit est assuré par l'intermédiaire d'une troisième électrode, appelée contre électrode ou électrode auxiliaire. Elle est constituée d'un fil de platine de faible diamètre. Le courant circule entre E_T et E_A (6).

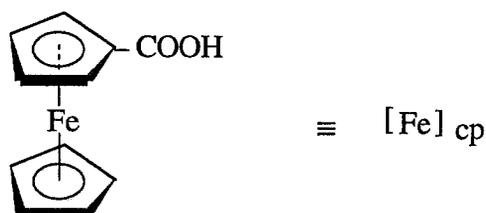
L'électrode de référence (E_R) est positionnée le plus près possible de E_T .

E_A doit être diamétralement opposée à E_R afin de ne pas être placée dans le champ électrique existant entre E_T et E_R .



III.4.4.2. Méthode

Les peroxydes lipidiques peuvent réagir directement, sans catalyseur, avec l'acide ferrocène monocarboxylique. Cet acide va être utilisé comme réactif intermédiaire au cours de nos essais.



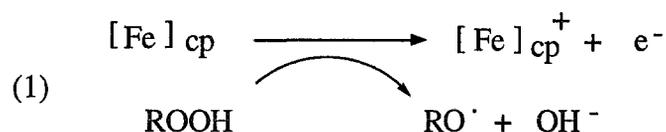
Acide ferrocène monocarboxylique

Dans cette étude, le dosage des peroxydes lipidiques est basé sur la mesure du courant cathodique due à la réduction électrochimique de l'acide ferricène monocarboxylique dont l'atome de fer a été oxydé à l'état ferrique. En effet, le complexe ferrique $[Fe] cp^+$ est produit lors de l'oxydation du ferrocène par les peroxydes.

L'ampérométrie, technique électrochimique, est choisie pour la détection des peroxydes. Elle est basée sur l'étude de la relation $f(E, i, c) = 0$ pour laquelle à un potentiel E fixe, l'intensité du courant i mesurée sera représentative de la concentration du composé réduit à l'électrode de travail.

Deux réactions successives vont avoir lieu. Dans un premier temps, une réaction chimique entre le ferrocène et les peroxydes. Dans un deuxième temps, une réaction électrochimique de réduction du complexe ferricène monocarboxylique.

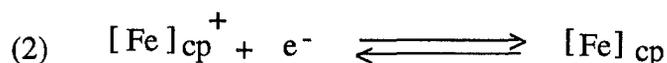
a. Réaction chimique: oxydation du fer ferreux du ferrocène par les acides gras peroxydés :



Grâce à leur pouvoir oxydant, les acides gras peroxydés permettent la formation d'un complexe ferrique $[Fe] cp^+$. Il faut noter que le fer est apporté dans le milieu réactionnel par l'intermédiaire d'un complexe particulier : l'acide ferrocène monocarboxylique, qui est soluble dans une zone de pH très étendue.

b. Réaction électrochimique: dosage ampérométrique.

Le complexe ferrique ionisé, précédemment formé, est réduit au niveau du carbone vitreux de l'électrode de travail. Le processus est monoélectronique et réversible.

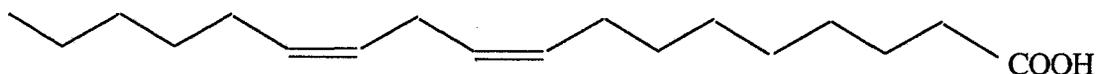


III.4.4.3. Travaux personnels

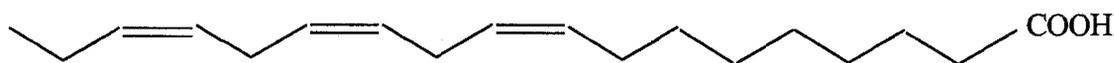
Ces travaux personnels ont été réalisés afin de mettre au point la méthode de détection des peroxydes.

Pour cela, dans un premier temps, des peroxydes d'acides gras ont été préparés à partir de l'acide linoléique (18: 2, n - 6) et linoléinique (18: 3, n -3).

Acide linoléique



Acide linoléinique



Une étude spectrophotométrique de leur comportement vis à vis du réactif (acide ferrocène monocarboxylique) a ensuite été réalisée en vue de les doser ampérométriquement.

a. Peroxydation des acides gras : mode opératoire

La préparation des peroxydes d'acides gras nécessite la présence de la lipoxydase, enzyme d'oxydation des acides gras.

Les acides gras, soit l'acide linoléique soit l'acide linoléinique (0,59 mM) en solution dans un mélange éthanol-tampon phosphate 0,1M à pH 7,8 sont oxydés par

barbotage d'oxygène pendant deux heures à température ambiante, en présence de l'enzyme ($1100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

A 100 ml de tampon pH 7,8, 20 ml d'éthanol à 96% sont ajoutés afin de permettre une solubilisation des acides gras et leur oxydation par la lipoxydase. Les acides gras peroxydés ainsi obtenus sont congelés dans des flacons de verre coloré, et stockés à -24°C .

b. Etude spectrophotométrique

Une étude en spectrophotométrie UV a été réalisée sur les peroxydes des acides linoléique et linoléique en vue de suivre leurs réactions de décomposition et de réduction.

b.1. Le spectre d'absorption de chaque acide peroxydé a été tracé de 200 à 300 nm. Chaque échantillon a été dilué dans une solution tamponnée à un pH de 7,8 (tampon phosphate à 0,1 M). La cuve en quartz de référence contient le tampon phosphate seul. Les spectres obtenus sont tout à fait comparables à ceux de la littérature (24).

A l'aide du coefficient d'extinction molaire publié par Mulchandani et al. (24), la concentration de chaque acide a pu être quantifiée.

Ainsi les solutions d'acides hydroperoxydés, après décongélation, ont été diluées extemporanément dans du tampon phosphate (0,1M, pH 7,8) afin d'obtenir des valeurs d'absorbance mesurables.

Sachant que $A = \epsilon lc$

avec $\epsilon = 28000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour l'acide linoléique et pour l'acide linoléique (24).

et $l = 1 \text{ cm}$, A étant l'absorbance et c la concentration du produit :

- pour l'acide linoléique peroxydé, l'absorbance maximale à 235 nm est de 0,841 après une dilution au 100^{ème} d'où une concentration de la solution mère décongelée de $30 \mu\text{M}$ (fig. 10).

- pour l'acide linoléique peroxydé, l'absorbance maximale à 237 nm est de 0,640 après une dilution au 10^{ème} d'où une concentration de la solution mère décongelée de $2,29 \mu\text{M}$ (fig. 11).

Remarque: Une dégradation des solutions d'acides gras peroxydés congelées a été observée au cours du temps. C'est pour cela qu'avant la réalisation de nouveaux essais, le calcul de leurs concentrations exactes a du être réalisé.

Figure 10 : Spectre d'absorption dans l'UV de *l'acide linoléique*

peroxydé dans le tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8)

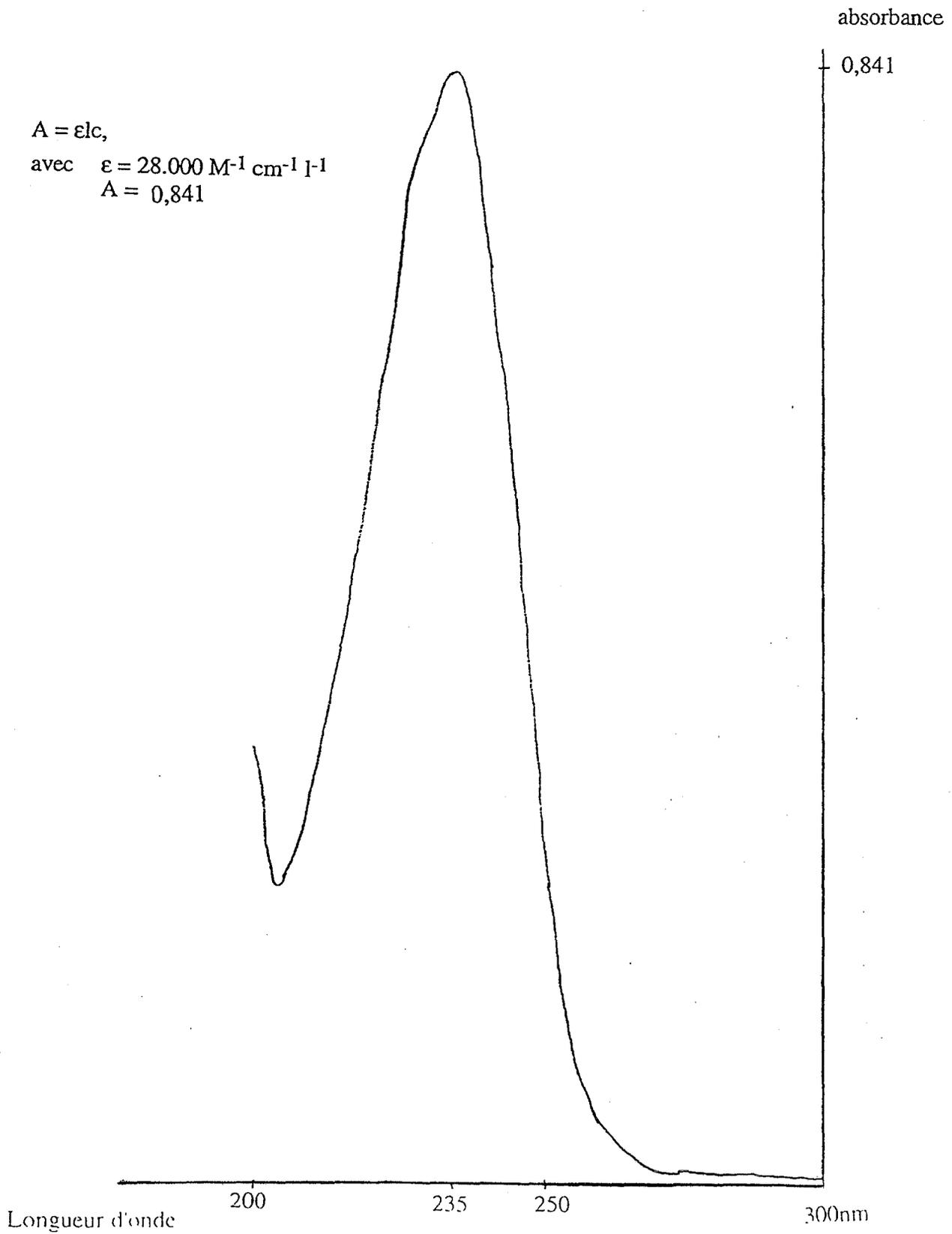
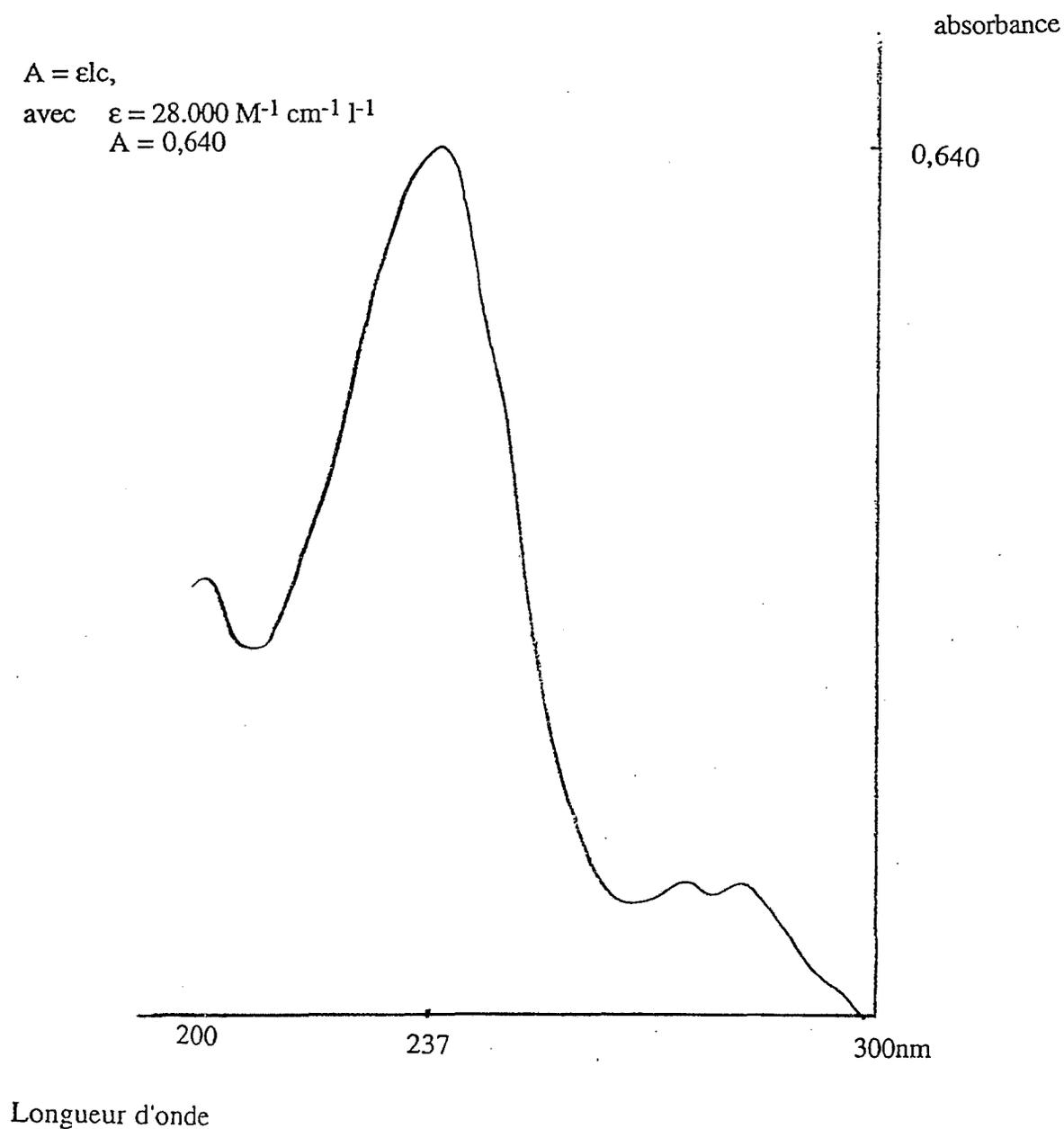


Figure 11 : Spectre d'absorption dans l'UV de *l'acide linoléique peroxydé* dans le tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8)



b.2. Réaction de réduction des acides gras peroxydés:

La réduction des peroxydes par l'acide ferrocène monocarboxylique a été suivie par spectrophotométrie.

Pour le tracé (200 à 300 nm) deux cuves en quartz ont été remplies successivement, l'une par 1,5 ml de tampon phosphate (cuve de référence), l'autre par 1,5 ml de la solution d'acide gras peroxydé. Dans chacune des cuves des volumes croissants d'une solution d'acide ferrocène monocarboxylique (5 mM) ont été rajoutés (compris entre 10 et 90 μ l).

Les tracés des spectres (figure 12) ont été obtenus après agitation et leur interprétation nous montre bien que la réaction d'oxydo-réduction a eu lieu.

D'après le graphe suivant qui en découle (figure 13), une relation de proportionnalité apparaît entre la quantité de réactif introduit et la disparition de l'acide gras peroxydé. L'acide ferrocène monocarboxylique est donc bien capable de réduire quantitativement les peroxydes.

c. Essais ampérométriques

Lors de leurs essais ampérométriques avec comme électrode de référence une électrode Ag/AgCl, Mulchandani et al. avaient fixé le potentiel à -100 mV. Cette valeur ayant été choisie de façon à obtenir un courant cathodique significatif le plus intense possible.

Pour notre part, le montage comprenant une électrode de référence au calomel saturé ($\text{Hg}^0/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$ saturé), un potentiel de -0,145 mV a été fixé tout au long de nos essais. Cette valeur du potentiel prend en compte la différence de potentiel qui existe entre les deux électrodes de référence.

Pour cette valeur de potentiel (-0,145 mV), le pH des solutions est fixé à 5,5 (à l'aide d'un tampon phosphate (0,1 M)), compte tenu du fait que dans ces conditions de pH et de potentiel, le courant cathodique est le plus intense d'après Mulchandani et al. La figure 14 montre que la réduction des acides gras par l'acide ferrocène monocarboxylique s'effectue sans problème à pH 5,5.

a. La méthode électrochimique utilisée pour la détection des lipides peroxydés demande des solutions desoxygénées, car l'oxygène dissous pourrait subir une réduction à l'électrode de travail et être responsable d'un important courant de fond.

Cependant au potentiel choisi pour nos essais, une réponse identique avait été observée par ces auteurs avec des échantillons desoxygénés ou non. Afin de vérification, nous avons comparé les courants obtenus dans les conditions suivantes : 10 ml d'une solution tamponnée (tampon phosphate pH 5,5) d'acide linoléique peroxydée (0,57 μ M), renfermant l'acide ferrocène monocarboxylique (0,1 mM, pH 5,5) a été placée dans la cellule du polarographe. Un courant d'environ 102 nA a été mesuré sans

dégazage, et un courant d'environ 100 nA a été mesuré après desoxygénation de la solution par passage d'un courant d'azote durant cinq minutes. Ces résultats montrent qu'à notre potentiel de travail (- 0,145 mV), l'oxygène ne perturbe aucunement la mesure du courant.

b. Sur cette même solution, nous avons voulu déterminer si le courant de diffusion enregistré était modifié lorsque l'électrode de travail était en rotation ou fixe. Les résultats obtenus sont les suivants :

Essais avec l'électrode tournante (2500 tours/min.) : environ 105 nA

Essais avec l'électrode fixe : environ 100 nA

Suite à ces différents essais nous avons constaté :

- qu'au potentiel choisi, la présence d'oxygène ne modifie pas le courant enregistré
- que le courant de convection apporté par la rotation de l'électrode de travail n'augmente pas de façon significative le courant de diffusion enregistré en régime stationnaire.

Aussi, avons-nous travaillé par la suite sans dégazage des solutions à analyser et en faisant tourner l'électrode de travail.

En vue d'établir une droite, corrélant la quantité de peroxydes en solution et le courant mesuré, une gamme d'étalonnage a été préparée.

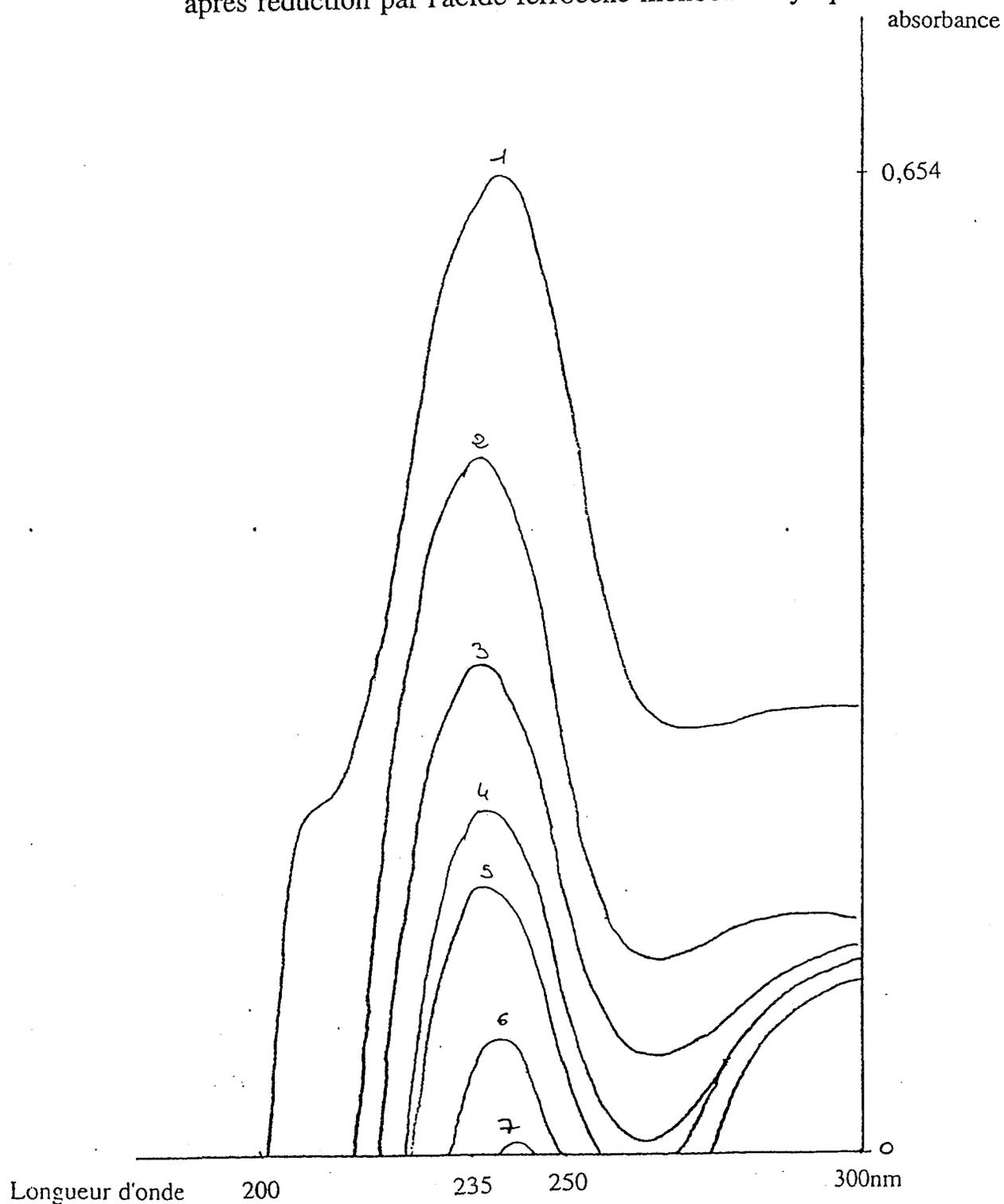
Les dilutions ci-dessous ont été réalisées pour l'acide linoléique à partir d'une solution mère à 2,29 μM . 10 ml de chaque solution fille ont été introduits dans la cellule (§ III.4.4.1). Le tableau VII montre les valeurs des courants mesurés.

Tableau VII : Gamme d'étalonnage

Solution mère d'acide gras peroxydée pH 5,5 (ml)	2,5	3	4,5	5
Solution de ferrocène 0,1mM pH 5,5 (ml)	5	5	5	5
Tampon phosphate 0,1 M pH 5,5 (ml)	2,5	2	0,5	0
Dilution réalisée	2,5/10	3/10	4,5/10	5/10
Solution fille: concentration en acide gras peroxydé (μM)	0,57	0,68	1,03	1,14
Courant mesuré (nA)	70	60	50	40

Figure 12 : Spectre d'absorption de *l'acide linoléique peroxydé*

après réduction par l'acide ferrocène monocarboxylique



Ajout de la solution à 5 mM d'acide ferrocène monocarboxylique
1. 10 μ l; 2. 20 μ l; 3. 30 μ l; 4. 40 μ l; 5. 60 μ l; 6. 80 μ l; 7. 90 μ l

Figure 13 : Suivi de la réaction de réduction de l'acide linoléique en UV par l'acide ferrocène monocarboxylique

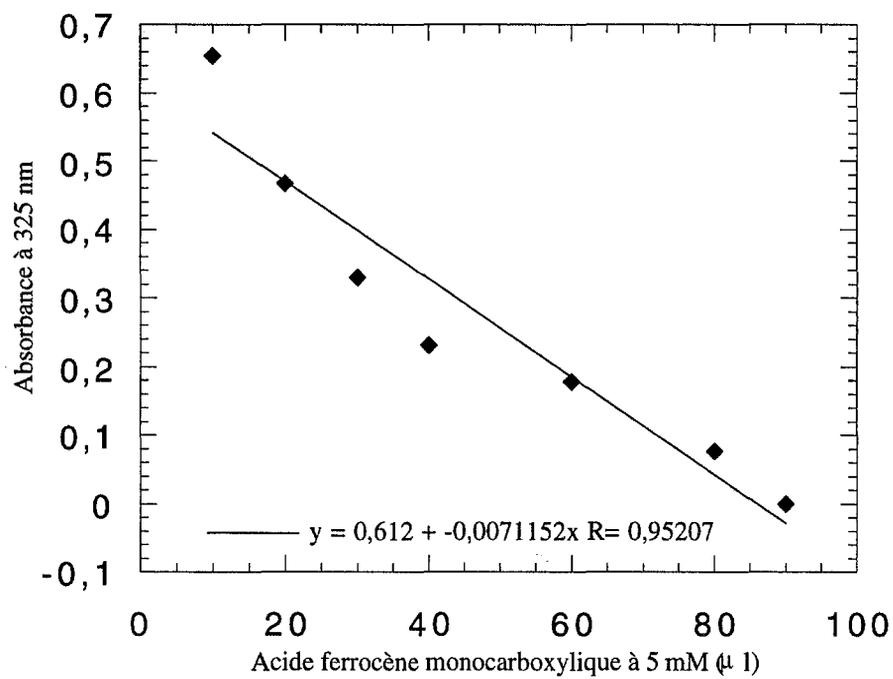
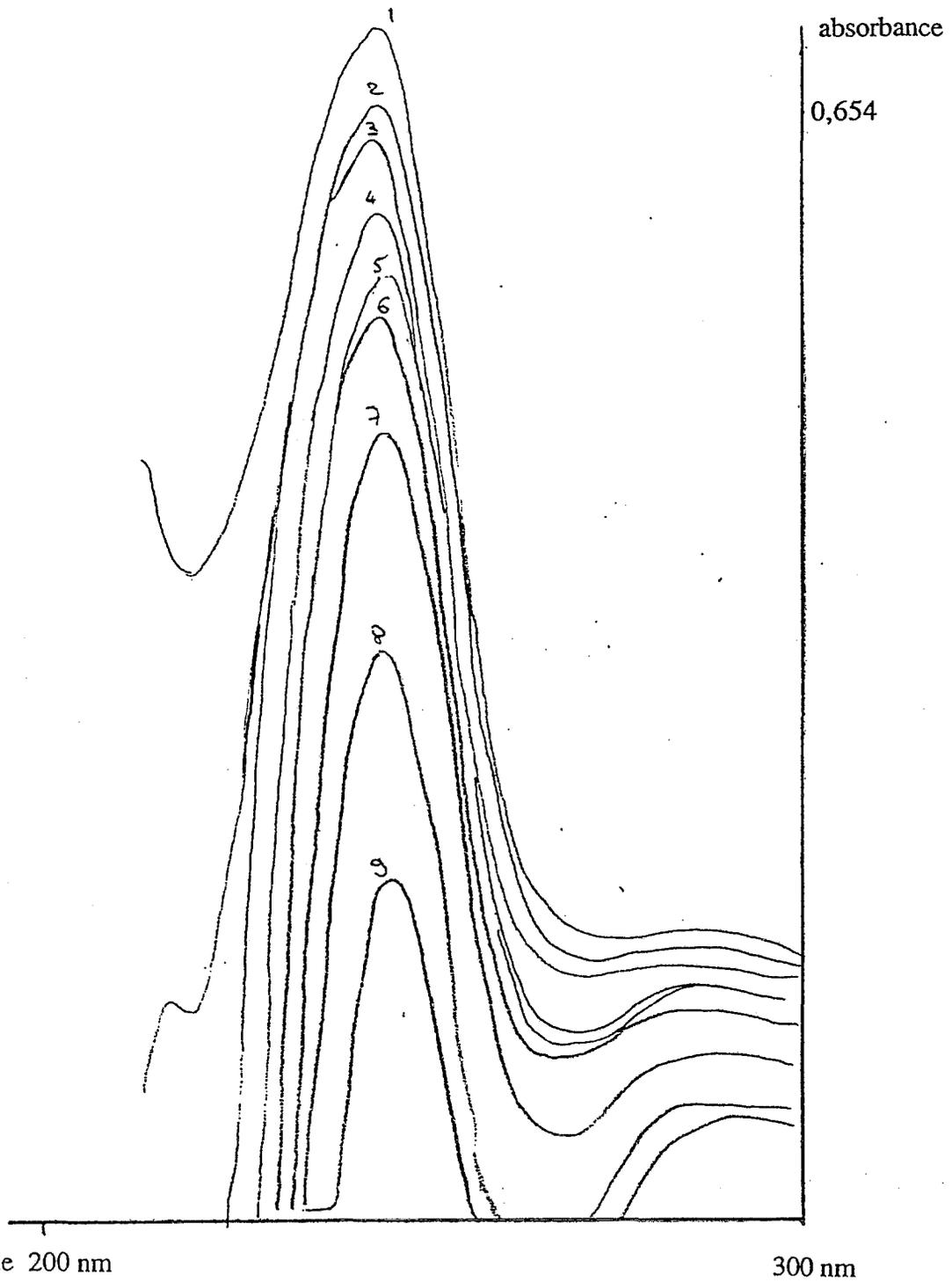


Figure 14 : Spectre d'absorption dans l'UV de l'*acide linoléique peroxydé* dans le tampon phosphate (0,1 M, pH 5,5) après réduction par des quantités croissantes d'acide ferrocène monocarboxylique



Ces essais nous ont malheureusement montré une absence de proportionnalité entre la quantité d'acides gras peroxydés introduits et le courant mesuré. De ce fait, d'autres essais ont été réalisés en gardant les mêmes conditions de travail, mais en modifiant les solutions. Ces tentatives n'ont fait que confirmer la non reproductibilité de la méthode.

Afin de comprendre le pourquoi de ce phénomène, les réactifs seuls ont été testés :

- 10 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 5,5 fait apparaître un courant d'environ 2 nA

- 10 ml de solution d'acide ferrocène monocarboxylique dans du tampon phosphate à pH 5,5 fait apparaître un courant d'environ 50 nA.

La solution d'acide ferrocène monocarboxylique (non oxydé) fait apparaître un courant très élevé pouvant provenir de l'électrolyse d'impuretés qui, ne provenant pas du tampon phosphate, ne peut être dû qu'au réactif commercial, bien que celui-ci soit de même origine que celui utilisé dans la littérature (24).

Une autre expérience a été réalisée afin de connaître le courant résiduel de l'ensemble du montage polarographique. Pour cela une solution aqueuse de KCl pure 0,1 M a été préparée et 10 ml ont été introduits dans la cellule. Une valeur de courant d'environ 60 nA a été mesurée. Le courant résiduel du montage est élevé, et de ce fait peut masquer les faibles variations apportées lors de la réduction du complexe. L'appareillage utilisé ne permet pas de compenser ce courant résiduel qui est semble-t-il un courant capacitif induit en partie par l'électrode solide.

III.4.4.4. Discussion

La publication sur laquelle nous nous sommes appuyés (24) pour réaliser nos travaux attire un certain nombre de remarques.

a. Concernant l'électrode de travail :

Les raisons du choix de l'emploi d'une électrode de travail en carbone vitreux n'ont pas été mentionnés. Pour ce type de détermination, il est classique d'utiliser une électrode à goutte de mercure, une électrode à film de mercure ou encore une électrode solide (barreau de graphite ou de platine). L'électrode en carbone vitreux, choisi par les auteurs, est une électrode de maintenance relativement simple bien qu'en pratique son polissage soit long et fastidieux. La réaction électrochimique monoélectronique mise en oeuvre (couple $[\text{Fe}]cp^+$, $[\text{Fe}]cp$) doit être parfaitement réversible sur le carbone vitreux et le dépôt de composé réduit ne doit pas perturber la détection ampérométrique.

Dans la littérature, il est indiqué que le mécanisme de réduction est monoélectronique et parfaitement réversible et, que la réaction électrochimique est rapide.

L'utilisation d'une électrode à goutte de mercure serait tout à fait performante pour la détermination ampérométrique. En effet la goutte de mercure peut être automatiquement renouvelée pour chaque détermination ce qui conduit à l'obtention d'une surface d'électrode parfaitement reproductible. Le polissage serait alors supprimé. De plus la surface des gouttes de mercure sphériques qui sont classiquement générées, est souvent supérieure à la surface d'un disque de carbone vitreux. Le courant de diffusion enregistré serait alors plus intense, ce qui améliorerait la sensibilité de la méthode.

b. Concernant le courant de fond:

Le ferrocène utilisé est de même provenance que celui préconisé dans la publication (24), or la solution de ferrocène, à elle seule, a montré lors de nos essais un courant déjà élevé. Aussi peut-on dire que le réactif commercialisé renferme des impuretés réductibles au potentiel de travail qui permet de détecter la réduction du couple $[\text{Fe}] \text{cp}^+ / [\text{Fe}] \text{cp}$. Dans la publication il n'est pas fait mention de purification préalable du réactif. Néanmoins les auteurs ont complété leur montage par un module "low-current module, PA1, BAS". Il semblerait qu'ils aient utilisé un compensateur de courant servant à éliminer le courant résiduel perçu lors des essais afin de pouvoir détecter des variations de potentiel de l'ordre du nA.

L'élimination du courant de fond peut également être possible soit à l'aide d'un montage particulier à "double cellule" soit, en purifiant les réactifs par une pré-électrolyse.

- Le montage à "double cellule" permet une lecture de la différence entre les deux cellules. La première cellule contiendrait le milieu réactionnel (les réactifs et la prise d'essai à analyser) pendant que la deuxième cellule contiendrait tous les réactifs renfermant les impuretés.

- La pré-électrolyse des réactifs n'a pu être faite car le polarographe utilisé (PRG5) ne possède pas un potentiostat de puissance qui aurait permis la réalisation de ce type de manipulation. En effet pour électrolyser un volume convenable de réactif (100 ml) l'emploi d'électrode de travail de grande surface (flaque de mercure de diamètre de 10 cm ou grille de platine d'environ 25 cm² minimum) est nécessaire. La résistance interne du montage aurait été, alors, très élevée conduisant au bout de quelques secondes à une saturation du potentiostat de faible puissance inclus dans le polarographe PRG5 dont nous disposons au laboratoire.

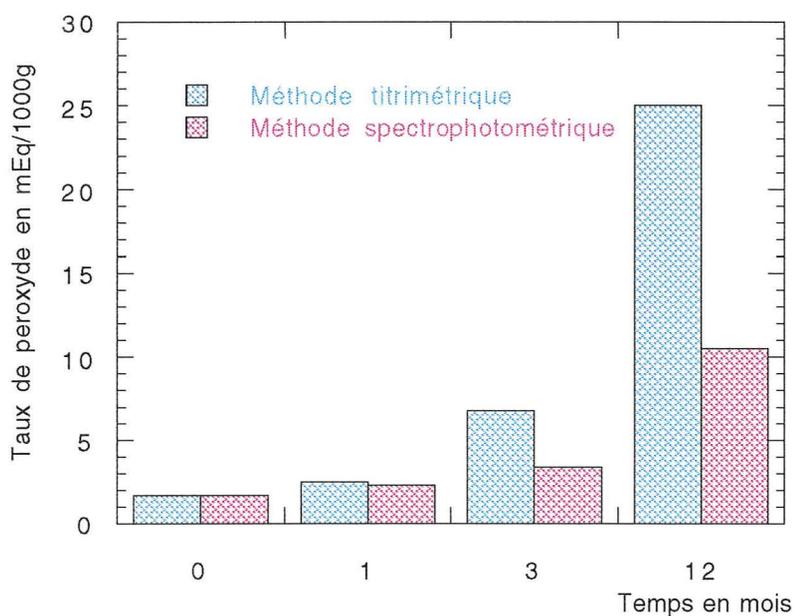
III.4.5. Discussion et conclusion

Au cours de cette étude un suivi du rancissement de l'huile de noix en fonction de divers paramètres (température, lumière, temps), a pu être réalisé grâce aux dosages des peroxydes. Ces dosages ont été réalisés selon trois méthodes: iodimétrique, spectrophotométrique et ampérométrique.

🍏 *Les méthodes iodimétrique et spectrophotométrique* ont mis en évidence l'accroissement du taux des peroxydes en fonction de l'augmentation de la température et de la lumière, ainsi que de la durée du stockage.

Cependant les valeurs obtenues aux mêmes intervalles de temps par ces deux méthodes (bien qu'allant toutes dans le sens de l'augmentation des peroxydes) ne coïncident pas vraiment. La détermination par titrimétrie donne des valeurs plus élevées que celles obtenues par la technique spectrophotométrique, comme le montre l'exemple suivant (figure 15)

Figure 15 : Comparaison des méthodes titrimétrique et spectrophotométrique sur l'huile de noix à 25°C et à l'obscurité



Ces différences pourraient s'expliquer par la valeur des potentiels redox (E°) des couples mis en jeu :

$$E^\circ = \text{I}^\circ / \text{I}^- = 0,54 \text{ V pour la méthode titrimétrique}$$

$$E^\circ = \text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+} = 0,76 \text{ V pour la méthode spectrophotométrique.}$$

La technique spectrophotométrique, basée sur l'oxydation des sels ferreux souffre moins d'interférences car les oxydants dosés doivent avoir un potentiel redox supérieur à 0,80.

🍏 *La méthode ampérométrique* n'a pu nous fournir des résultats exploitables.

Les différentes expérimentations réalisées montrent que nous avons bien pu préparer des acides gras peroxydés et que l'oxydation de l'acide ferrocène monocarboxylique par les acides peroxydés est bien quantitative (suivi par UV). Nous avons pu déterminer qu'un courant de fond trop élevé perturbe la détection ampérométrique des peroxydes. En effet, celui-ci empêche de mettre en évidence les faibles variations de courant (quelques nA) dues à la présence des peroxydes.

Si nous avons pu résoudre le problème lié au courant résiduel à l'aide d'un appareillage adéquat, l'application à l'huile de noix aurait pu être envisagée. La mise au point de la détermination des peroxydes dans l'huile n'aurait certainement pas été facile. Une dissolution préalable de l'huile à l'aide d'un solvant organique relativement apolaire (DMF, DMSO) aurait été nécessaire. Nous aurions du ensuite trouver le bon électrolyte support à ajouter dans le solvant afin de rendre conducteur le milieu et de ce fait permettre à la réaction électrochimique de se faire. L'emploi d'un mélange solvant organique-tampon aurait pu être également envisagé. Le solvant permettant la solubilité de l'huile et le tampon le bon pH pour garder un processus monoélectronique réversible et rapide pour le couple $[\text{Fe}] \text{cp}^+ / [\text{Fe}] \text{cp}$.

III.5. Recherche dans l'huile de noix des hydrocarbures de faibles poids moléculaires

Pour compléter notre étude précédente nous avons évalué le rancissement d'une huile de noix par la mesure des fragments hydrocarbures formés au cours du cycle d'oxydation (4) (12) (13) (26) (35). Ces fragments correspondent aux produits secondaires d'oxydation et se forment par coupure de la double liaison des acides gras insaturés. Des hydrocarbures de faible poids moléculaire, tel que l'hexane, se forment. Nous allons essayer de mettre en évidence cet alcane en chromatographie en phase gazeuse (CPG), par la méthode de l'espace de tête.

III.5.1. Principe de la méthode

L'hexane, hydrocarbure de faible poids moléculaire va être étudié par la technique de CPG-espace de tête.

La méthode de *l'espace de tête* (head-space) est une détermination indirecte de la concentration de produits en phase liquide. Elle permet la recherche et l'analyse des constituants volatils dans des solides ou des liquides tels que l'huile de noix.

Pour obtenir la phase gazeuse à injecter, l'échantillon liquide (l'huile de noix) est placé dans une étuve à température et durées déterminées. Lorsque l'équilibre entre les phases liquides et gazeuses est établi, on prélève à l'aide d'une seringue étanche aux gaz, la phase gazeuse qui sera ensuite injectée dans le chromatographe afin de pouvoir séparer les différents substrats volatils.

Les échantillons utilisés sont les mêmes que ceux stockés pour les autres techniques de dosage. Ils devraient renfermer plus ou moins d'hexane en fonction de la durée du stockage et donc du degré de rancissement de l'huile.

III.5.2. Dosage par CPG

La chromatographie en phase gazeuse, CPG, (3) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexes, de nature et de volatilité très diverses.

L'appareillage comprend : un injecteur utilisé en mode splitless, une colonne chromatographique introduite dans un four à température variable, un détecteur à ionisation de flamme. Un intégrateur donne les surfaces des pics et une imprimante permet la sortie du chromatogramme.

- **Le système d'injection** de l'échantillon gazeux split / splitless est utilisé en mode splitless c'est à dire que la prise d'essai est injectée en totalité. L'échantillon gazeux contenu dans la seringue est injecté manuellement dans le système au travers d'un septum. La température de l'injecteur est portée à 220°C pour assurer la volatilité de l'échantillon.

- **Les phases mobile et stationnaire**

Comme toute technique chromatographique la séparation des produits injectés se fait par l'intervention de deux phases, une phase mobile et une phase stationnaire. Elle dépend des polarités de la phase stationnaire et des substances à analyser.

- **La phase mobile** est représentée par un gaz dit vecteur ou porteur : l'hélium. C'est dans son flux que le produit à analyser est injecté et que les substances seront véhiculées jusqu'au détecteur à travers toute la colonne chromatographique qui renferme la phase stationnaire.

Ce gaz doit être

- inerte, à la fois vis à vis des solutés et de la phase stationnaire
- pur, exempt d'eau, d'oxygène qui pourrait réagir avec la phase stationnaire et ne pas contenir d'hydrocarbures dont la présence introduirait la possibilité de pics "fantômes".
- son débit est de 3 cm³/minute
- la pression en tête de colonne est de 5 psi

- **La phase stationnaire** est représentée par une colonne capillaire polaire DBWAX (type carbowax 20 M) de 30 m de long, 0,53 mm de diamètre interne et dont l'épaisseur du film est de 0,5 µm.

La programmation de température du four est présentée figure 16.

Figure 16 : Programmation de température du four

```
METHOD 1 0-0
TIME 15:24          09 JAN 97
REV 9701091431

INITIAL COLUMN TEMP 100°
INITIAL COL HOLD TIME 10.00

      FINAL      HOLD      TOTAL
PRGM  TEMP  RATE  TIME  TIME
  1    200  10.0  25.00  45.00

INJECTOR TEMP 220°
INJ HOLD TIME 0.00

DETECTOR TEMP 220°

ECC A      ATTN RANGE A/Z
           8      1 NO

FID B      ATTN RANGE A/Z
           2     11 YES

PLOT SPEED 0.5 CM/MIN
ZERO OFFSET 10 %
PLOT SIGNAL B
TIME TICKS YES
INSTR EVENT CODES YES
USER NUMBER 0-0
PRINT USER NUMBER YES
PRINT REPORT YES
PRINT RUN LOG NO

INITIAL RELAYS -1

RELAYS
PRGM  TIME  STATE
  1    1.00  1

RUN MODE 1 - ANALYSIS
PEAK MEASUREMENT PARAMETER 1 - AREA
LONG REPORT FORMAT NO
RESULT CALCULATION TYPE 1 - AREA %
DIVISOR 1.00000000
AMOUNT STANDARD 1.00000000
MULTIPLIER 1.00000000
RESULT UNITS
REPORT UNIDENTIFIED PEAKS YES
UNIDENTIFIED PEAK FACTOR 0.00000000
SAMPLE ID
SUBTRACT BLANK BASELINE NO
PEAK REJECT VALUE 2000
SIGNAL TO NOISE RATIO 5
TANGENT PEAK HEIGHT 10
INITIAL PEAK WIDTH 2
```

• **Le détecteur à ionisation de flamme (FID)** est le plus couramment utilisé : les effluents de la colonne chromatographique et le gaz vecteur pénètrent dans une flamme d'hydrogène. Une arrivée d'air alimente la combustion. Ainsi les solutés organiques forment des ions qui sont collectés au moyen de deux électrodes entre lesquelles on applique une différence de potentiel. Ces ions sont collectés par la cathode. Il en résulte un courant électrique qui est recueilli par un électromètre transformateur d'impédance qui le transforme en une tension pouvant être enregistrée.

Ce détecteur ne répond pas ou pratiquement pas aux gaz permanents, même carbonés, ni aux composés inorganiques. Il est utilisé ici à une température de 220 °C.

- Le débit d'hydrogène est de 20 cm³/minute
- Le débit d'azote/oxygène est de 350 cm³/minute

III.5.3. Préparation des échantillons

Les échantillons, 2 ml, sont introduits dans des flacons en verre de 15 ml, rigoureusement identiques, fermés à l'aide de bouchons de caoutchouc puis sertis.

Ils sont alors placés dans une étuve chauffée pendant 45 minutes. Différentes températures (90°C, 120°C, 150°C et 180°C) ont été choisies pour volatiliser l'hexane afin de déterminer la température convenant le mieux à la détection et à l'isolement de cet alcane. La phase gazeuse, en surface du substrat, est alors prélevée (1 ml) au travers du bouchon de caoutchouc à l'aide d'une seringue préalablement chauffée. Elle est alors immédiatement injectée au travers d'un septum dans le chromatographe.

Plusieurs séries d'échantillons ont été préparées sans ou avec addition de Florisil®. Le Florisil®, silicate de magnésium activé, est un adsorbant qui retient les matières organiques et les composés polaires, qui ne fixera donc pas les hydrocarbures tel que l'hexane.

- *L'échantillon d'hexane pur* est analysé en vue de déterminer les conditions de l'étude et ainsi son temps de rétention sur le chromatogramme.

- *L'échantillon d'hexane, additionné de 2 g de Florisil®*, est analysé en vue de confirmer que l'hexane n'est pas retenu par le Florisil®.

- *L'échantillon d'huile pure* seule permet d'obtenir un chromatogramme-type pour une huile donnée et pour des conditions d'analyse fixées.

- *L'échantillon d'huile est additionné de Florisil®* afin d'évaluer l'action de ce dernier sur le chromatogramme.

- L'échantillon d'huile pure, 10 ml, est additionné de 0,2 cm³ d'hexane afin de mettre en évidence l'hexane présent dans l'huile grâce à l'augmentation de la surface du pic de cet hydrocarbure.

- L'échantillon d'huile est additionné de 0,2 cm³ d'hexane et de 2 g de Florisil®.

III.5.4. Résultats et interprétation

• Les échantillons (§ III.5.3.) ont été portés à différentes températures pendant 45 minutes avant d'être injectés dans l'appareil. Les chromatogrammes obtenus ont confirmé que plus la température de l'échantillon est élevée plus le nombre de substances détectables et donc volatilisées est important.

• Quelle que soit la température de chauffage des échantillons, la comparaison des différents types d'échantillons, deux à deux, et pour une même température de chauffage a permis de montrer les points suivants :

- pour les chromatogrammes hexane (figure 17) et hexane + Florisil® (figure 18)
L'hydrocarbure de faible poids moléculaire, l'hexane, apparaît à un temps de rétention court d'environ 0,98 minute. L'apport de Florisil® ne gêne ni la détection, ni l'analyse de l'hydrocarbure, et d'autre part il n'apporte pas d'impuretés visibles sur le chromatogramme.

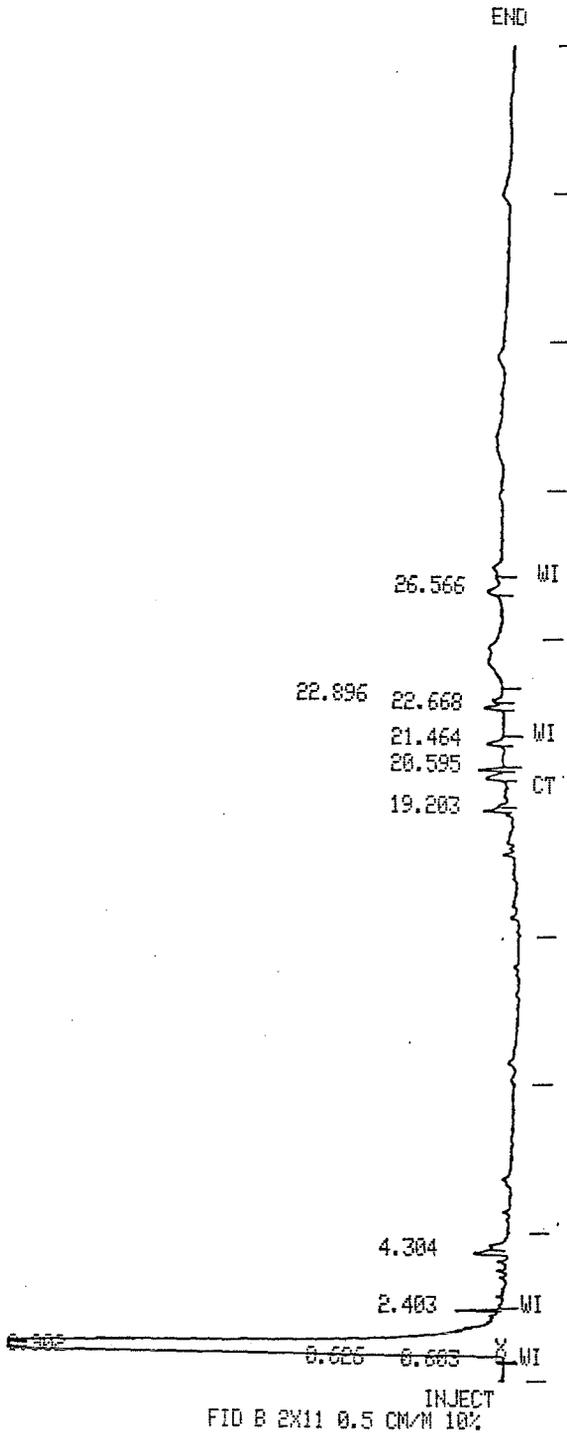
- pour les chromatogrammes huile (figure 19) et huile + hexane (figure 20)

L'hexane rajouté à l'huile est mis en évidence, mais nous avons malheureusement constaté que pour un même échantillon il existe trop de différences d'un essai à l'autre pour permettre une bonne analyse de cet hydrocarbure. L'hexane présent dans l'huile, s'il existe est en trop faible quantité pour pouvoir être détectable.

- pour les chromatogrammes huile (figure 19) et huile + Florisil® (figure 21, 22) ainsi que les chromatogrammes huile + hexane (figure 20) et huile + hexane + Florisil® (figure 23).

Certaines substances volatiles sont retenues par le Florisil®. Ce dernier permet de simplifier le chromatogramme mais l'amélioration de la détection de l'hexane dans la zone de l'hydrocarbure est négligeable.

Figure 17 : Chromatogramme de l'hexane chauffé à 120°C



VARIAN 3400 GAS CHROMATOGRAPH
 METHOD 1 RUN 139
 TIME 14:33 10 JAN 97
 SAMPLE:
 RUN MODE: ANALYSIS
 CALCULATION TYPE: PERCENT
 USER NO: 0-0

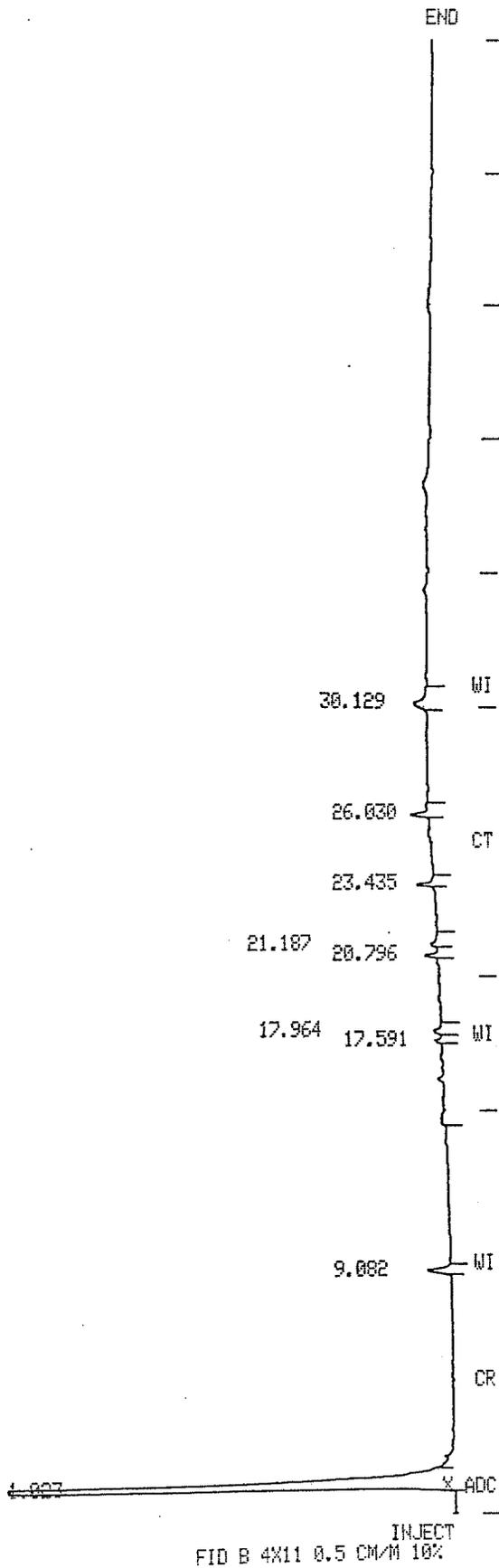
PEAK NO.	PEAK NAME	TIME MIN	RESULT	AREA COUNTS
1		0.902	96.9062	3604067
2		0.968	2.0749	77188
3		1.269	0.0091	3315
4		2.403	0.1097	4000
5		4.304	0.1381	5139
6		19.203	0.0575	2140
7		20.595	0.0091	3689
8		21.464	0.1338	4979
9		22.668	0.1380	5136
10		22.896	0.0981	3651
11		26.566	0.1550	5766

TOTALS: 100.0000 3719955

DETECTED PEAKS: 13 REJECTED PEAKS: 2
 AMOUNT STANDARD: 1.0000000
 MULTIPLIER: 1.0000000 DIVISOR: 1.0000000
 NOISE: 142.0 OFFSET: -46

ERROR LOG:
 ANNOTATION OMITTED

Figure 18 : Chromatogramme de l'hexane + Florisil®
chauffé à 120°C



VARIAN 3400 GAS CHROMATOGRAPH
METHOD 1 RUN 177
TIME 11:00 27 JAN 97
SAMPLE:
RUN MODE: ANALYSIS
CALCULATION TYPE: PERCENT
USER NO: 0-0

PEAK NO.	PEAK NAME	TIME MIN	RESULT	AREA COUNTS
1		1.023	99.8797	65820790
2		9.082	0.0250	16520
3		17.591	0.0051	3407
4		17.964	0.0094	6212
5		20.796	0.0119	7885
6		21.187	0.0076	5010
7		23.435	0.0160	10549
8		26.030	0.0185	12208
9		30.129	0.0264	17461

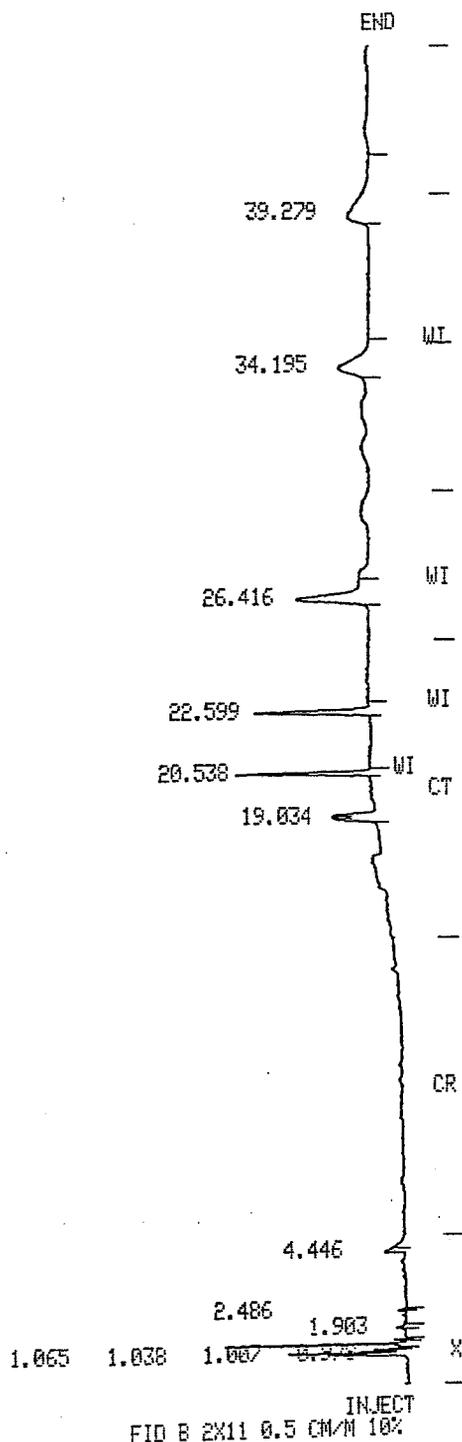
TOTALS: 100.0000 65900045

DETECTED PEAKS: 9 REJECTED PEAKS: 0
AMOUNT STANDARD: 1.0000000
MULTIPLIER: 1.0000000 DIVISOR: 1.0000000
NOISE: 128.5 OFFSET: -13

ERROR LOG:
ADC OVERRANGE

NOISE = 128.5

Figure 19 : Chromatogramme de l'huile chauffé à 120°C



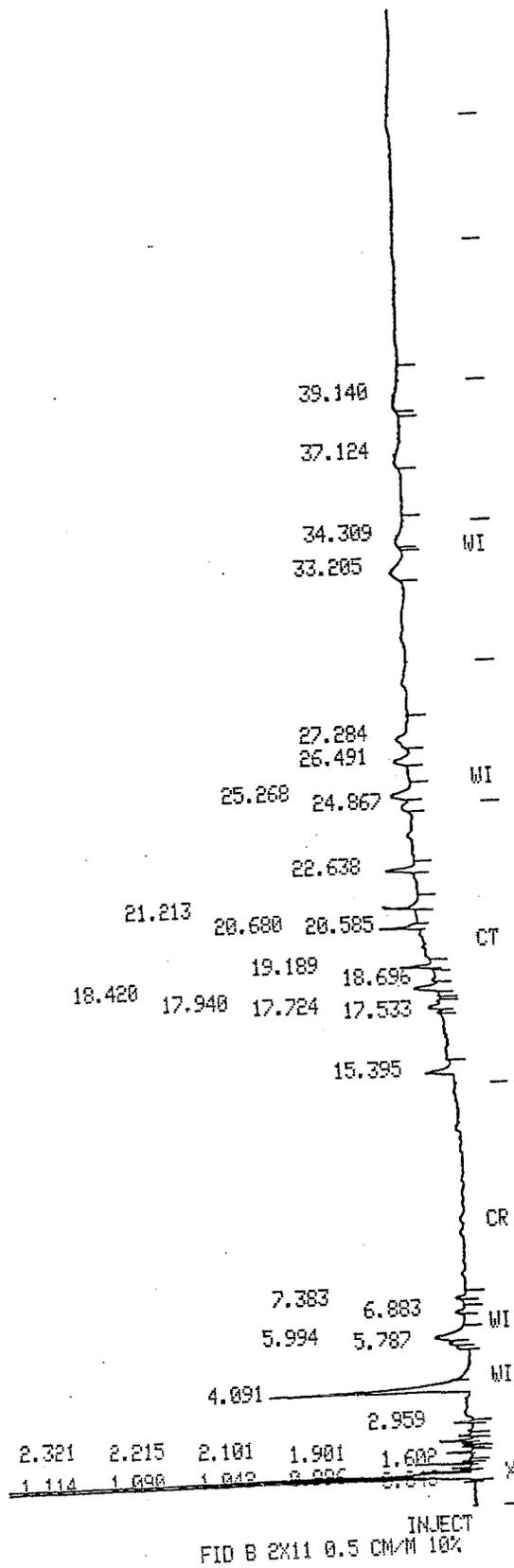
VARIAN 3400 GAS CHROMATOGRAPH
 METHOD 1 RUN 138
 TIME 13:43 10 JAN 97
 SAMPLE:
 RUN MODE: ANALYSIS
 CALCULATION TYPE: PERCENT
 USER NO: 0-0

PEAK NO.	PEAK NAME	TIME MIN	RESULT	AREA COUNTS
1		0.978	1.5445	3029
2		1.038	2.2295	4372
3		1.356	4.7556	9326
4		4.446	1.6991	3332
5		19.034	1.1668	2288
6		20.538	14.6800	28790
7		22.599	17.4332	34190
8		26.416	20.2485	39712
9		34.195	16.1563	31686
10		39.279	20.0859	39393

TOTALS: 100.0000 196122

DETECTED PEAKS: 19 REJECTED PEAKS: 9
 AMOUNT STANDARD: 1.0000000
 MULTIPLIER: 1.0000000 DIVISOR: 1.0000000
 NOISE: 142.0 OFFSET: 58

Figure 20 : Chromatogramme de l'huile + hexane chauffé à 120°C



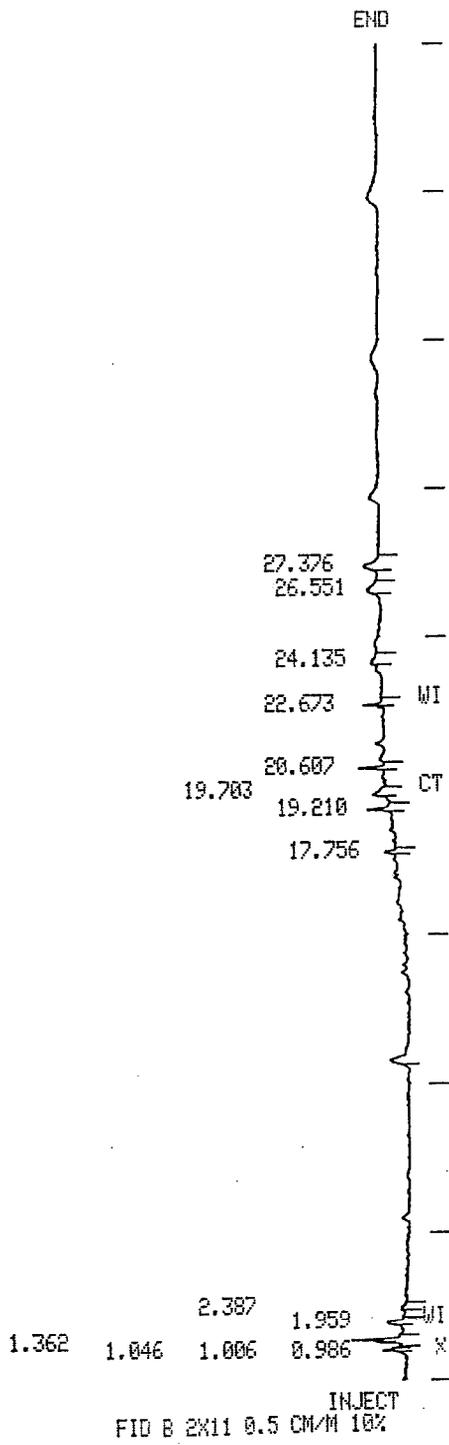
VARIAN 3400 GAS CHROMATOGRAPH
 METHOD 1 RUN 131
 TIME 13:31 09 JAN 97
 SAMPLE:
 RUN MODE: ANALYSIS
 CALCULATION TYPE: PERCENT
 USER NO: 0-0

PEAK NO.	PEAK NAME	TIME MIN	RESULT	AREA COUNTS
1		0.996	16.9565	58430
2		1.042	2.7903	9615
3		1.090	7.7401	26672
4		1.114	2.1267	7328
5		1.513	1.3603	4687
6		1.901	0.5911	2036
7		2.321	1.0323	3557
8		2.959	0.6427	2215
9		4.091	18.6130	64139
10		5.767	2.6368	9086
11		5.994	5.1349	17694
12		6.883	0.6218	2142
13		7.383	0.6040	2081
14		15.395	2.6615	9171
15		17.724	1.2187	4199
16		18.420	2.7722	9553
17		19.189	1.5723	5418
18		20.585	2.1322	7347
19		21.213	4.0834	14071
20		22.638	2.5133	8660
21		24.867	1.4638	5044
22		25.268	3.4337	11832
23		26.491	2.4465	8430
24		27.284	3.4614	11927
25		33.205	4.1932	14449
26		34.309	1.8496	6373
27		37.124	2.9642	10214
28		39.140	2.3819	8208

TOTALS: 100.0000 344592

DETECTED PEAKS: 43 REJECTED PEAKS: 15
 AMOUNT STANDARD: 1.0000000
 MULTIPLIER: 1.0000000 DIVISOR: 1.0000000
 NOISE: 121.7 OFFSET: -23

Figure 21 : Chromatogramme de l'huile + Florisil® chauffé à 120°C



VARIAN 3400 GAS CHROMATOGRAPH
 METHOD 1 RUN 136
 TIME 09:33 10 JAN 97
 SAMPLE:
 RUN MODE: ANALYSIS
 CALCULATION TYPE: PERCENT
 USER NO: 0-0

PEAK NO.	PEAK NAME	TIME MIN	RESULT	AREA COUNTS
1		1.362	24.9851	11237
2		1.959	10.0934	4539
3		19.210	8.6922	3909
4		19.783	7.3221	3293
5		20.607	9.4828	4265
6		22.673	12.0642	5426
7		26.552	11.8624	5335
8		27.376	15.4973	6970

TOTALS: 100.0000 44976

DETECTED PEAKS: 14 REJECTED PEAKS: 6
 AMOUNT STANDARD: 1.0000000
 MULTIPLIER: 1.0000000 DIVISOR: 1.0000000
 NOISE: 142.0 OFFSET: -46

ERROR LOG:
 ANNOTATION OMITTED

Figure 22 : Chromatogramme de l'huile + Florisil® chauffé à 150°C

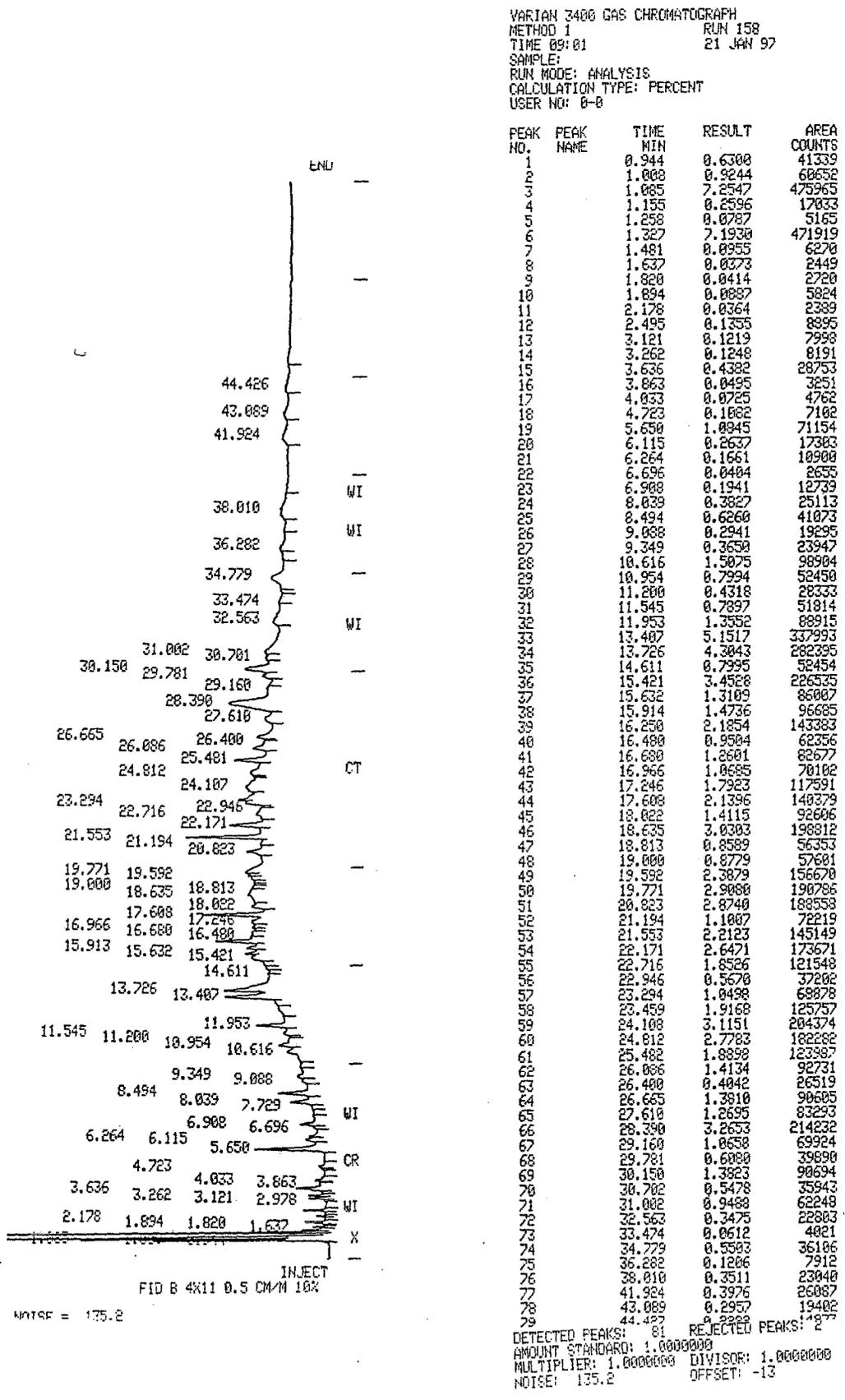
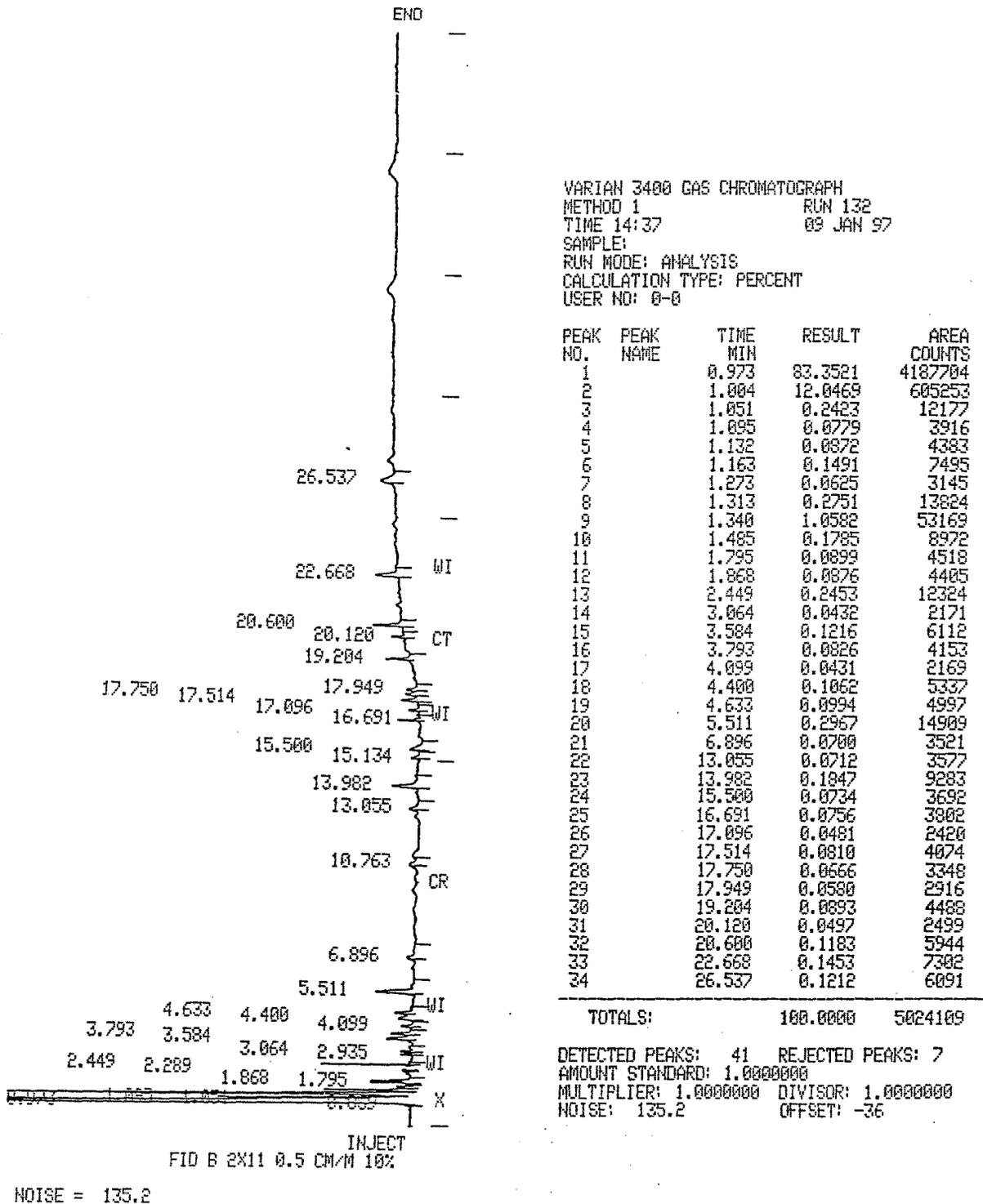


Figure 23 : Chromatogramme de l'huile + hexane + Florisil®
chauffé à 120°C



III.5.5. Bilan et conclusion

Cette méthode n'a pas permis de mettre en évidence la libération d'hexane au cours du rancissement d'une huile de noix.

La quantité d'hexane formée au cours de ce rancissement est en trop faible quantité pour pouvoir être détectée par cette méthode, d'autant plus que d'autres substances volatiles apparaissent à des temps de rétention très proches de celui de l'hexane.

Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en déterminant quelle est la limite de détection de l'hexane par cette méthode.

III.6. Dosage des tocophérols

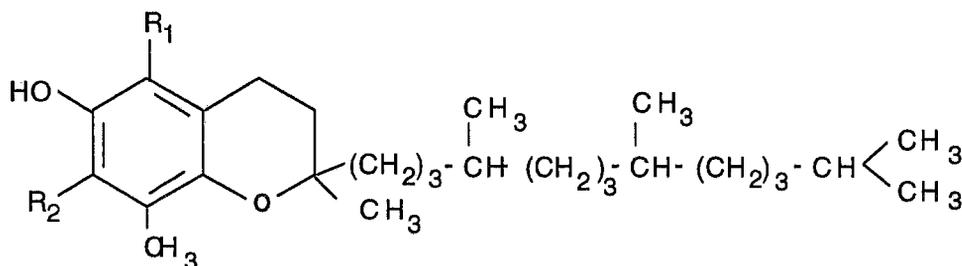
III.6.1. Les tocophérols

Les tocophérols sont des antioxydants d'origine naturelle qui peuvent également être reproduits par synthèse. Ils sont solubles dans les graisses et dans les solvants apolaires (16).

III.6.1.1. Structures

Ce sont des molécules phénoliques dérivées du chromane, qui varient en fonction du nombre et de la position des substituants méthyle fixés sur le cycle benzénique (dérivés α , β , γ , δ).

Leur formule sont les suivantes :



R1	R2	
CH ₃	CH ₃	α -tocophérol
CH ₃	H	β -tocophérol
H	H	δ -tocophérol
H	CH ₃	γ -tocophérol

III.6.1.2. Activité des tocophérols

Ces molécules sont douées de propriétés vitaminiques E, l'isomère α est le plus actif dans ce domaine, ainsi que de propriétés antioxydantes, l'isomère γ est alors le plus efficace.

Ils sont utilisés comme antioxydants dans les aliments, sous forme d'extraits naturels (mélange d'isomères) ou sous forme de dérivés de synthèse isolés (7).

Leur grande solubilité dans les huiles et graisses et leur propriété d'être des donneurs de protons leur permet d'interrompre les réactions radicalaires se produisant lors de l'oxydation, donc de protéger ces matières grasses (7).

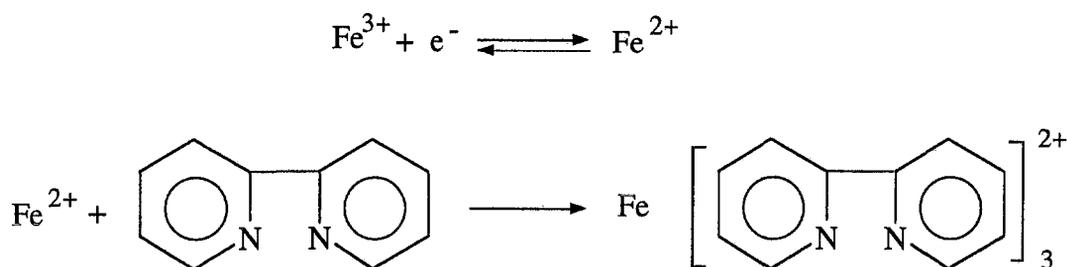
Un ajout de tocophérols a en particulier été proposé pour ralentir le rancissement de l'huile de noix (5).

III.6.1.3. Origine des tocophérols

Les tocophérols existent dans de nombreuses substances végétales notamment dans la sauge et le romarin et également dans les huiles, en particulier dans l'huile de noix. Certains fabricants proposent d'utiliser des condiments à base d'extrait de romarin soit pour stabiliser les huiles et graisses, soit pour protéger les caroténoïdes de l'oxydation, soit encore pour inhiber les phénomènes de brunissement ou préserver la flaveur des aliments (23).

III.6.1.4. Dosage des tocophérols

Les tocophérols isolés peuvent être dosés globalement grâce à leurs propriétés réductrices vis-à-vis des sels ferriques (30), les ions ferreux formés étant alors dosés par colorimétrie après complexation par l' α,α' -dipyridyle :



Le complexe formé, coloré en rouge, permet une estimation quantitative par colorimétrie.

Pour notre part, nous n'avons pu utiliser cette méthode du fait que nous travaillons sur les tocophérols au sein de l'huile de noix, or cette méthode colorimétrique n'est pas spécifique des tocophérols.

De plus nous voulions doser sélectivement les différents tocophérols, ce qui est également impossible par cette méthode.

Nous avons donc utilisé la CLHP couplée à la spectrométrie UV (20), ce qui nous permet de séparer les différents tocophérols présents dans l'huile, puis de les doser.

Les différents tocophérols n'ayant pas les mêmes propriétés, il importe cependant de les doser sélectivement, ce qui pourra être réalisé par chromatographie liquide haute performance.

III.6.2. Les tocophérols de l'huile de noix

Compte-tenu des propriétés antioxydantes des tocophérols, nous nous sommes intéressés à la présence de ces antioxydants et à l'effet favorable éventuel d'un ajout d' α ou de γ tocophérol dans cette huile, respectivement E 307 et E 308.

III.6.2.1. Principe de la méthode

Les tocophérols des échantillons témoins, mélange de tocophérols et de carotènes, (§ III.6.3.) et des échantillons d'huile (avec et sans ajout de tocophérol) sont dosés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

Les différents échantillons sont directement injectés dans l'appareil puis séparés grâce à un gradient de concentration fixé par programmation. Ce gradient réalisé à l'aide de trois solvants (méthanol, butanol, eau) forme la phase mobile polaire. La détection de ces antioxydants se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

III.6.2.2. Technique chromatographique

Pour estimer les tocophérols initialement présents nous avons décidé d'utiliser la chromatographie liquide haute performance, en utilisant le phénomène de partage en phase inverse.



a. L'appareillage : le chromatographe VARIAN utilisé comporte différentes parties :

- *Les réservoirs de solvants* qui sont au nombre de trois. Il s'agit de flacons renfermant les phases mobiles polaires. Le pH de la phase mobile doit être inférieur à 8. La colonne chromatographique est composée de silice et un milieu alcalin détruirait la phase stationnaire en dissolvant la silice.

- *Une pompe ternaire* (VARIAN 9010) permettant de faire un gradient de solvant. Grâce à cet équipement il est possible de faire varier les proportions des différents composants de la phase mobile, donc de diminuer les temps d'analyses et d'améliorer la résolution des pics.

- *Un injecteur automatique* comportant un plateau où peuvent être disposés plusieurs échantillons. Pour leur prélèvement des aiguilles sont utilisées pour percer le septum en plastique qui bouche les échantillons et pour aspirer un volume précis d'échantillon (20 µl).

- *Une colonne chromatographique* Sphérisorb ODS 2 (5µm). Cette colonne renferme une silice greffée en C18, apolaire, dont le diamètre des pores est de 80 Å.

- *Un four* permettant de thermostatier la colonne à la température de 31°C.

- *Un détecteur UV-visible* (VARIAN 9050) à longueurs d'onde variables permettant de modifier la longueur d'onde de détection en cours d'analyse.

- *Un intégrateur* Merck D2500, permettant de noter les temps de rétention et de mesurer l'aire des pics.

b. Technique opératoire

La phase mobile est constituée de méthanol, butanol et eau. Ces solvants sont filtrés sur membrane filtrante Millipore 0,45 µm et dégazés au moyen d'ultra-sons.

Le gradient utilisé est présenté dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Gradient de concentration de la phase mobile

Temps (min)	A (%) Méthanol	B (%) Butanol	C (%) eau	Débit (ml/min)
0	85	5	10	0,8
5	89	5	6	1,2
19	89	5	6	1,2
20	89	11	0	1,0
30	89	11	0	1,0
31	85	5	10	0,8

A un temps de rétention (TR) donné correspond une substance précise. La longueur d'onde (λ) qui varie en fonction du programme choisi, permettra la détection des produits étudiés.

Ainsi au bout de 31 minutes le chromatogramme est disponible et la lecture des aires des pics des témoins et des échantillons peut être faite.

Compte-tenu des temps de rétention des différentes molécules étudiées, la détection est réalisée dans les conditions décrites dans le tableau IX.

Tableau IX : Programme de détection

Produits analysés	Temps (min)	λ (nm)	TR (min)
δ Tocophérols	7	292	9,00
γ Tocophérols			10,45
α Tocophérols			11,91
α Carotène	19	450	27,73
β Carotène			28,29

Ainsi au bout des 7 minutes de programmation le gradient permettra de mettre en évidence les différents tocophérols qui seront "lus" à 292 nm de longueur d'onde.

III.6.3. Préparation des échantillons :

Les échantillons "témoins" ont été préparés à l'aide des tocophérols et des carotènes du commerce.

- Solutions témoins

Environ 20 mg d' α , de γ et de δ tocophérols (exactement pesés) sont dissous dans 20 ml de méthanol.

Environ 25 mg d' α et de β carotènes (exactement pesés) sont dissous dans 50 ml d'hexane.

La solution finale est réalisée en prenant 1 ml de chacune des solutions et en amenant à 100 ml par du méthanol.

Cette solution renferme donc environ 1 mg de chaque tocophérol et environ 0,5 mg de chaque carotène dans 100 ml.

- Solutions essais

- Huile de noix sans ajout

- Huile de noix renfermant 40 mg d' α tocophérol (FLUKA) pour 100 ml

- Huile de noix renfermant 40 mg de γ tocophérol (ICN) pour 100 ml

Les différentes solutions sont ensuite stockées à la chambre froide, à + 4°C.

Au moment de l'analyse, les huiles sont diluées à raison de 1 g dans 20 ml de mélange méthanol-butanol.

- Analyse chromatographique

Les échantillons avant d'être injectés dans le chromatographe sont filtrés sur filtre millipore 0,5 μ m.

Ils sont introduits dans les petits flacons de l'injecteur automatique, avec leur bouchon plastique. Le prélèvement de chaque échantillon (20 μ l) se fera de façon automatique, de même que l'injection.

III.6.4. Résultats

III.6.4.1. Calcul de la concentration en tocophérol dans l'huile de noix

Pour la réalisation du calcul les abréviations suivantes ont été utilisées :

- **CE**, Concentration (g de tocophérol / l d'huile) de l'échantillon essai d'huile de noix (normal, avec ou sans ajout de tocophérol)
- **CT**, Concentration (g de tocophérol / l d'huile) de l'échantillon témoin préparé au laboratoire
- **SE**, Surface de l'échantillon essai d'huile de noix (normal, avec ou sans ajout de tocophérol)
- **ST**, Surface de l'échantillon témoin préparé

Pour connaître les concentrations en tocophérol le calcul est basé sur l'égalité suivante :

$$\frac{CE}{SE} = \frac{CT}{ST}$$

soit

$$CE = \frac{CT \times SE}{ST} \text{ en g/l}$$

lors de la préparation une dilution au 20^{ème} dans une fiole jaugée a été effectuée :

$$CE = \frac{CT \times SE \times 20}{ST} \text{ en g/l dans les 20 ml de préparation}$$

soit pour une prise d'essai de **PE** (g)

$$CE = \frac{CT \times SE \times 20}{ST \times PE} \text{ en g/l}$$

et

$CE = \frac{CT \times SE \times 20 \times 100}{ST \times PE}$

en mg de tocophérol
pour 100g d'huile de noix

III.6.4.2. Résultats

Les résultats sont représentés sous forme de chromatogramme et de tableaux.

A. Chromatogrammes

A titre d'exemple nous présentons un chromatogramme de chaque type d'échantillon.

La comparaison des chromatogrammes (figures 25, 26 et 27) avec le chromatogramme témoin (figure 24) nous montre l'absence d' α carotène et de β carotène dans l'huile de noix analysée.

La comparaison des chromatogrammes 26 et 27 avec le chromatogramme 25 montre l'addition d' α tocophérol dans le chromatogramme 26 et de γ tocophérol dans le chromatogramme 27.

B. Tableaux

Ces résultats présentent les aires des pics obtenus pour les témoins et les essais.

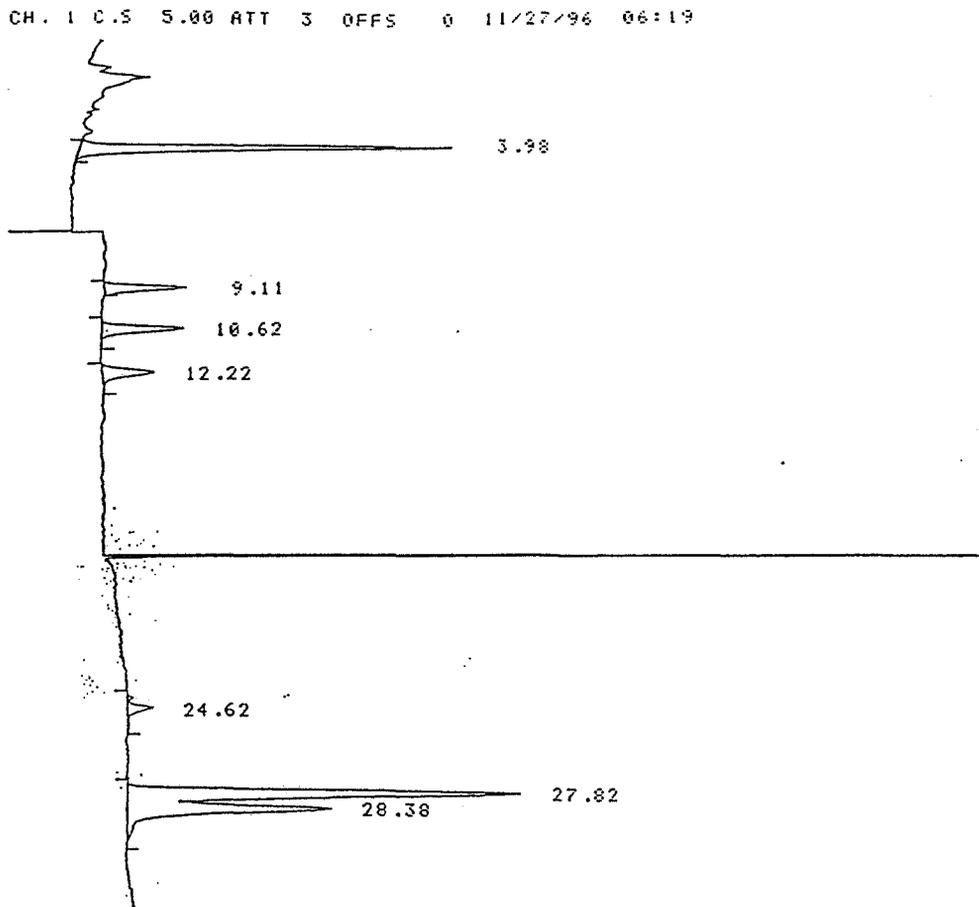
1) Echantillons témoins

Nous avons fait huit essais témoins afin de pouvoir calculer les coefficients de variation donc de tester la fiabilité de la méthode. Seule la moyenne des témoins a été prise en compte pour les calculs de la concentration des essais (CE).

a. Surface des échantillons témoins (ST) :

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
test 1	10 374	12 141	9 758
test 2	9 967	11 598	9 585
test 3	10 412	12 219	10 128
test 4	10 671	11 609	10 036
test 5	10 684	11 814	8 778
test 6	9 702	11 185	9 108
test 7	10 499	11 815	9 069
test 8	9 953	11 828	10 219
Moyenne	10 282,7	11 776,1	9 585,1
Ecart-type	364,3	326,0	544,5
Coefficient de variation (%)	3,6	2,8	5,7

Figure 24 : Chromatogramme de l'échantillon témoin



0-2500

11/27/96 06:19

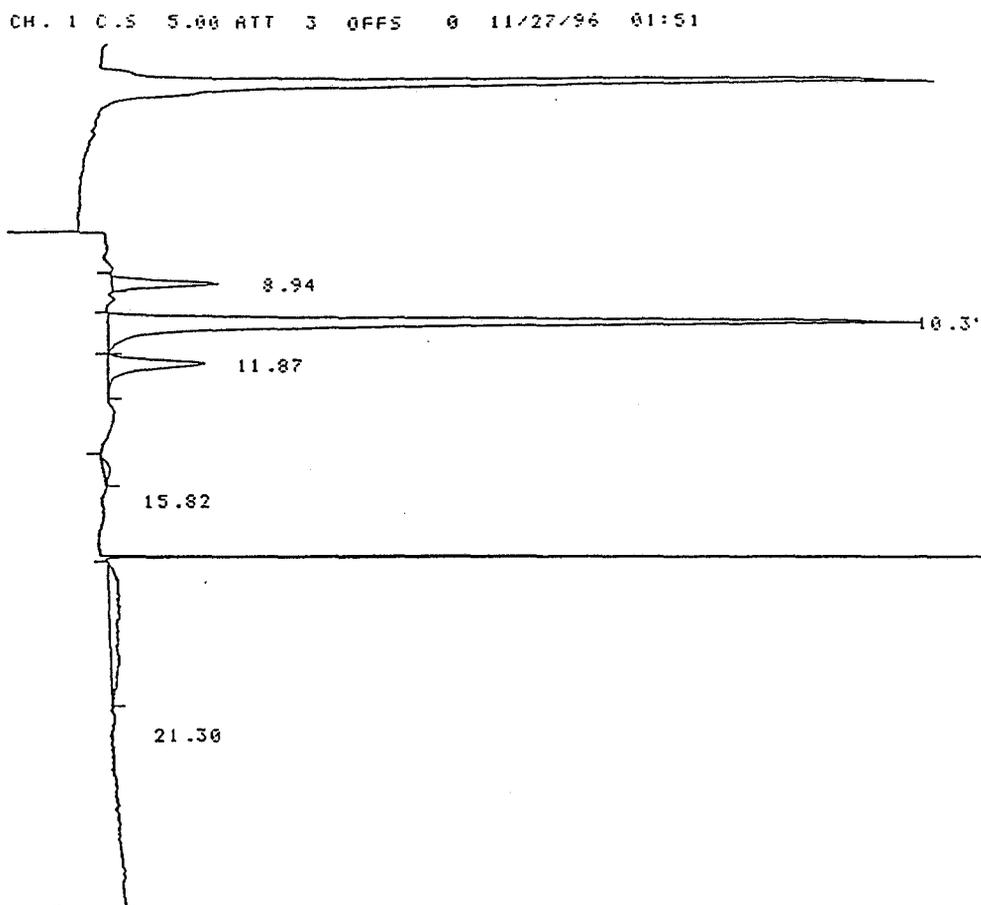
METHOD: VITAMINES--- TAG: 27 CH: 1

FILE: 0. CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	3.98	38936	21.104	BB
2	9.11	10374	5.623	BB
3	10.62	12141	6.581	BB
4	12.22	9758	5.289	BB
5	24.62	4294	2.327	BB
6	27.82	67735	36.713	BU
7	28.38	41260	22.363	UB

L
 184498 100.000
 500

Figure 25 : Chromatogramme de l'huile de noix
sans ajout de tocophérol



D-2500

11/27/96 01:51

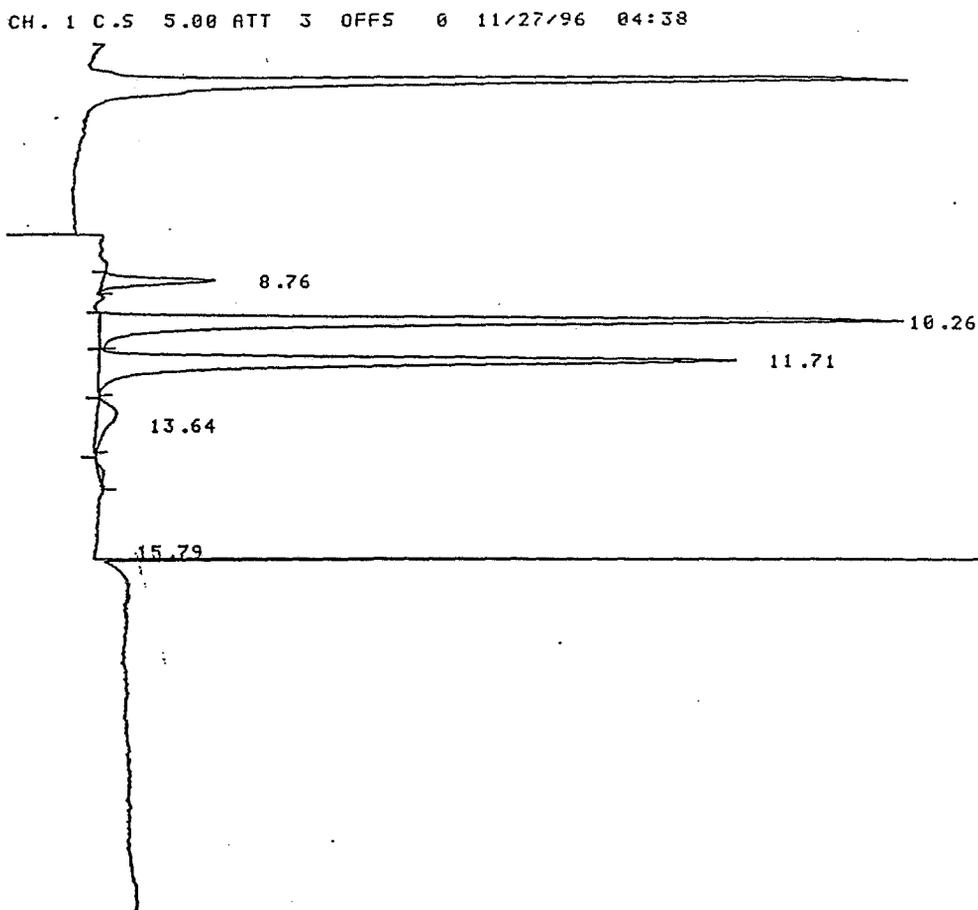
METHOD: VITAMINES--- TAG: 19 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	8.94	15581	7.801	BB
2	10.35	140962	70.572	BB
3	11.87	20302	10.164	BB
4	15.82	2565	1.284	BB
5	21.30	20332	10.179	BB
TOTAL		199742	100.000	
PEAK REJ :		500		

Figure 26 : Chromatogramme de l'huile de noix

avec ajout d' α tocophérol



D-2500

11/27/96 04:38

METHOD: VITAMINES- α TAG: 24 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	8.76	16813	5.572	BB
2	10.26	143373	47.512	BB
3	11.71	129841	43.027	BB
4	13.64	10381	3.440	BB
5	15.79	1355	0.449	BB

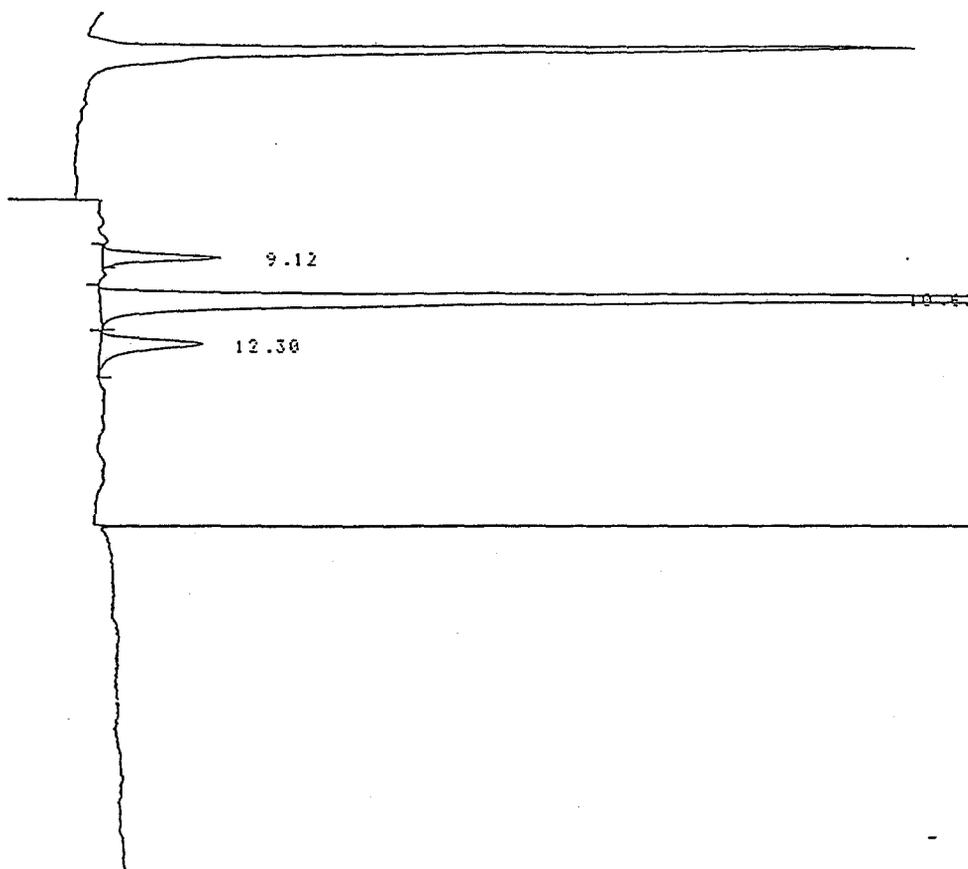
TOTAL
301763 100.000

PEAK REJ : 500

Figure 27 : Chromatogramme de l'huile de noix

avec ajout d'γ tocophérol

CH. 1 C.S 5.00 ATT 3 OFFS 0 11/27/96 07:59



D-2500

11/27/96 07:59

METHOD: VITAMINES--- TAG: 30 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	9.12	18668	5.957	BB
2	10.62	268261	85.598	BB
3	12.30	26468	8.446	BB

TOTAL

313397 100.000

PEAK REJ : 500

b. Concentration en tocophérols dans le témoin (CT) :

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
Concentration du témoin (mg/ml)	3,2 10^{-3}	3,4 10^{-3}	2,8 10^{-3}

2) Huile de noix sans ajout de tocophérol

Ces essais ont été réalisés sur l'huile de noix "normale" c'est à dire sans aucun ajout de tocophérol.

a. Surface des pics chromatographiques de l'huile de noix (SE):

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
Essai 1	15 581	140 962	20 303
Essai 2	16 611	139 936	21 265
Essai 3	16 121	144 589	22 431
Essai 4	16 704	146 453	22 174
Moyenne	16 254,2	142 985	21 543,2
Ecart-type	516,6	3 054,4	9 660,4
Coefficient de variation (%)	3,2	2,1	4,5

b. Concentration en tocophérols dans l'huile (CE)

Dans ce cas, chacun des résultats correspond à un essai particulier par exemple à la surface de l'essai 1 correspondra la concentration de ce même essai 1.

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
Prise d'essai (g)	1,0324	1,0324	1,0324
Essai 1 (mg/100g)	4,74	39,65	5,68
Essai 2 (mg/100g)	5,05	39,36	5,95
Essai 3 (mg/100g)	4,90	40,67	6,28
Essai 4 (mg/100g)	5,08	41,19	6,20
Moyenne (mg/100g)	5,0	40,2	6,0
Ecart-type	0,2	0,9	0,3
Coefficient de variation (%)	3,2	2,1	4,5

Remarque : Cette huile de noix "normale" contient nettement plus de γ tocophérol que de δ et d' α tocophérols.

3) Huile de noix avec ajout d' α ou de γ tocophérol

Deux types d'échantillons différents sont étudiés : l'un avec ajout d' α tocophérol l'autre avec ajout de γ tocophérol.

Comme précédemment chacun des résultats correspond à un essai particulier par exemple à la surface de l'essai 1 correspondra la concentration de ce même essai 1.

Le bilan de nos résultats sera représenté par les moyennes obtenues dans les trois types d'essais.

3.1. Ajout d' α tocophérol

a. Surface des pics chromatographiques de l'huile de noix (SE) :

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
Essai 1	16 813	143 373	129 841
Essai 2	16 321	146 144	131 478
Essai 3	16 186	148 097	132 289
Essai 4	16 647	145 718	130 427
Moyenne	16 491,7	145 833,0	131 008,8
Ecart-type	288,6	1 939,7	1 089,5
Coefficient de variation (%)	1,7	1,3	0,8

b. Concentration en tocophérols dans l'huile (CE) :

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
Prise d'essai (g)	1,0206	1,0206	1,0206
Essai 1 (mg/100g)	5,17	40,79	36,76
Essai 2 (mg/100g)	5,02	41,58	37,23
Essai 3 (mg/100g)	4,98	42,14	37,46
Essai 4 (mg/100g)	5,12	41,46	36,93
Moyenne (mg/100g)	5,1	41,5	37,1*
Ecart-type	0,1	0,5	0,3
Coefficient de variation (%)	1,7	1,3	0,8

L'addition d' α tocophérol par rapport à l'huile de noix de base (2.b.) apparaît nettement dans ce tableau.

3.2. Ajout de γ tocophérol

a. Surface des pics chromatographiques de l'huile de noix (SE) :

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
Essai 1	18 223	268 733	24 637
Essai 2	17 994	268 673	25 762
Essai 3	18 668	268261	26 468
Essai 4	17 734	268 150	26 342
Moyenne	18 154,7	268 454,3	25 802,2
Ecart-type	396,2	291,8	835,5
Coefficient de variation (%)	2,2	0,1	3,2

b. Concentration en tocophérols dans l'huile (CE) :

	δ tocophérol	γ tocophérol	α tocophérol
Prise d'essai (g)	1,0401	1,0401	1,0401
Essai 1 (mg/100g)	5,43	75,02	7,15
Essai 2 (mg/100g)	5,50	75,03	6,84
Essai 3 (mg/100g)	5,64	74,90	7,35
Essai 4 (mg/100g)	5,35	74,87	7,31
Moyenne (mg/100g)	5,5	75,0*	7,17
Ecart-type	0,1	0,1	0,2
Coefficient de variation (%)	2,2	0,1	3,2

L'addition de l' γ tocophérol par rapport à l'huile de base, apparaît nettement.

III.6.6. Evolution au cours du stockage

Toutes ces huiles (avec et sans ajout de tocophérol) ont été conservées en chambre froide à 4 °C. Deux séries d'essais ont été réalisés après un an de stockage sur les mêmes échantillons afin de connaître l'évolution des tocophérols dans l'huile de noix au cours du temps.

🍏 Les essais réalisés le 27/11/96 nous ont donné les résultats suivants :

	Huile de noix normal	Huile de noix + α tocophérol	Huile de noix + γ tocophérol
δ tocophérol (mg/100g)			
moyenne	m= 4,9	m= 5,1	m= 5,5
écart-type	σ = 0,2	σ = 0,1	σ = 0,1
γ tocophérol (mg/100g)			
moyenne	m= 40,2	m= 41,5	m= 74,9
écart-type	σ = 0,9	σ = 0,5	σ = 0,1
α tocophérol (mg/100g)			
moyenne	m= 6,0	m= 37,1	m= 7,2
écart-type	σ = 0,2	σ = 0,3	σ = 0,2

🍏 Les essais réalisés le 09/10/97 nous ont donné les résultats suivants :

	Huile de noix normal	Huile de noix + α tocophérol	Huile de noix + γ tocophérol
δ tocophérol (mg/100g)			
moyenne	m= 4,7	m= 4,1	m= 4,6
écart-type	σ = 0,3	σ = 0,2	σ = 0,5
γ tocophérol (mg/100g)			
moyenne	m= 37,1	m= 39,5	m= 68,2
écart-type	σ = 1,4	σ = 0,7	σ = 1,0
α tocophérol (mg/100g)			
moyenne	m= 5,5	m= 37,8	m= 6,5
écart-type	σ = 0,4	σ = 0,5	σ = 0,4

Les tableaux précédents montrent qu'après un an de stockage les quantités de tocophérols, dans l'huile de noix, semblent avoir légèrement baissé. Cependant compte-tenu des écart-types cette diminution n'est pas significative.

Pour apprécier l'influence d'un ajout d' α ou de γ tocophérol sur la conservation de l'huile de noix, donc sur sa peroxydation, nous avons voulu déterminer l'indice de peroxyde sur ces huiles, comparativement à une huile normale sans ajout. Seule la comparaison de l'huile normale et de l'huile avec ajout de 40 mg de γ tocophérol pour 100 ml (ce qui correspond à la quantité que l'on ajoute habituellement pour conserver les matières grasses) a pu être réalisée.

Les résultats au temps zero ont donné un indice de peroxyde de 5,70 mEq d'O₂/1000 g sur l'huile normale. Au bout d'un an de stockage à 4°C et à l'abri de la lumière nous avons obtenu les résultats du tableau X.

Tableau X : Comparaison de l'huile de noix avec ou sans ajout de γ tocophérol après un an de stockage :

	Huile de noix normale	Huile de noix + γ tocophérol
Indice de peroxyde	6,79	6,81
(mEq d'O ₂ /1000 g)	6,32	6,54
	5,80	6,80
Moyenne	6,30	6,71

Les résultats obtenus sont assez surprenants, puisque l'ajout de γ tocophérol n'a eu aucun effet favorable. Il faudrait renouveler cette expérience et la compléter en testant à la fois l' α et le γ tocophérol.

Conclusion :

Le dosage des tocophérols dans une huile de noix a été effectué par CLHP. La teneur de ces antioxydants dans l'huile avant et après leur ajout a pu être déterminée et aucune évolution nette de leur taux n'a été mise en évidence, après un an.

Leur présence et leur addition à une certaine concentration aurait dû améliorer la stabilité de l'huile et en particulier empêcher sa peroxydation. Les résultats partiels obtenus n'ont cependant pas mis en évidence d'effet protecteur. Ceci peut tout simplement être du au fait que l'huile était déjà protégée par ses tocophérols naturels. L'indice de peroxyde trouvé après 1 an est en effet particulièrement faible.

THESE SOUTENUE PAR : PERA Hélène

TITRE : Huile de noix : Paramètres qui influencent son rancissement, méthodes d'études et possibilité de protection

CONCLUSIONS

Notre objectif était d'évaluer l'évolution de la composition de l'huile de noix au cours de son stockage dans différentes conditions et notamment d'apprécier son rancissement.

Pour cela, nous avons testé l'évolution des indices de carbonyle, d'acide et de peroxyde au cours du temps, à différentes températures, en présence ou non d'air et à l'abri ou non de la lumière.

Certains auteurs ayant signalé la libération d'hydrocarbures de faible masse molaire au cours des phénomènes d'oxydation des huiles (en particulier l'hexane), nous avons recherché ce dernier par chromatographie gazeuse. Nous n'avons cependant pas pu le mettre en évidence dans nos échantillons.

L'indice de carbonyle, déterminé par titrimétrie, n'a pas donné de résultats homogènes.

Nous avons par contre nettement mis en évidence que les indices d'acide et de peroxyde varient non seulement en fonction de la température et de la durée du stockage, mais également par suite de l'exposition à la lumière et de la présence d'oxygène.

Pour l'évaluation des peroxydes, nous avons testé et comparé différentes méthodes : iodimétrique (indice de peroxyde), spectrophotométrique et ampérométrique. Cette dernière n'a pu fournir des résultats exploitables.

Nous avons également dosé par CLHP les tocophérols présents dans l'huile de noix. Puis nous avons surchargé l'huile analysée avec les isomères α et γ , que nous avons mis en évidence par la technique de CLHP.

Nous n'avons pu, après un an de stockage, mettre en évidence à l'aide de l'indice de peroxyde, l'amélioration de la stabilité de l'huile, que celle-ci soit additionnée ou non d' α ou de γ tocophérol.

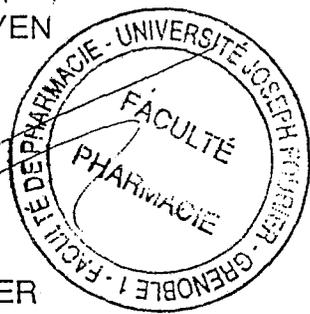
Ces résultats montrent bien qu'il est nécessaire de stocker l'huile de noix à l'abri de la lumière et de l'oxygène de l'air.

Certains résultats sont concluants, d'autres devront être complétés et confirmés, mais nous espérons avoir apporté une contribution à la meilleure connaissance de ce produit alimentaire régional digne d'intérêt qu'est l'huile de noix.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

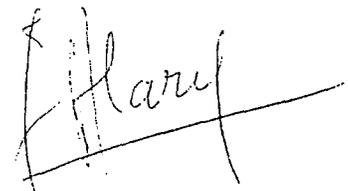
Grenoble, le 12 mars 1998

LE DOYEN



A. FAVIER

LE PRESIDENT DE THESE



PROFESSEUR: J. ALARY



Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

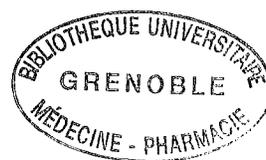
De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALARY J.
La noix, son huile et son tourteau.
Lyon pharmaceutique, 1985, **36** : 2 : 93-95.
- (2) ALARY J., LAVEDRINE F., ROUSSEL A.M., RAVEL A.
Noix et santé.
Bull. Trav. Société de Pharmacie de Lyon, 1996, **40** : 126-137.
- (3) ARPINO P., PREVOT A., SERPINET J., TRANCHANT J., VERGNOL A.,
WITIER R.
Manuel pratique de CPG.
Masson, Paris, 1995.
- (4) BARBIERI G., BOLZONI L., CARERI M. *et al.*
Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese.
J. Agric. Food Chem., 1994, **42** : 1170-1176.
- (5) BOURGEOIS C.
Des antioxygènes pour prévenir le rancissement des aliments.
Ind. Aliment. Agric., 1994 : 549-552.
- (6) CANTIN D.
Application de la polarographie à la détermination quantitative de molécules
d'intérêt pharmaceutique.
Doctorat d'Etat, ès-science pharmaceutique, Grenoble, 1976.
- (7) CASTERA-ROSSIGNOL A., BOSQUE F.
Nouvelle approche des antioxydants.
Oléagineux Corps Gras Lipides, 1994, **1** : 22 : 131-143.
- (8) CHIBA T., TAKAZAWA M., FUJIMOTO K.
A Simple Method for Estimating Carbonyl Content in Peroxide-Containing Oils.
J. Am. Oil Chem. Soc, 1989, **66** : 11 : 1588-1592.



- (9) FEINBERG M., FAVIER J.C., IRELAND-RIPORT J.
Répertoire général des aliments.
Table de composition des corps gras.
Tec et Doc-Lavoisier, Paris, 1987.
- (10) FOURIE P.C., BASSON D.S.
Predicting Occurrence of Rancidity in Stored Nuts by Means of Chemical Analyses.
Leben.-Wiss. Technology, 1989, **22** : 251-253.
- (11) GREGORY D.
Antioxydants-The natural answer.
Food, 1984, **6** : 18-22.
- (12) GRÜN I.U., BARBEAU W.E., CROWTHER J.B.
Changes in Headspace Volatiles and Peroxide Values of Undeodorized Menhaden Oil over 20 Weeks of Storage.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44** : 1190-1194.
- (13) GUINDA A., LANZON A., ALBI T.
Differences in Hydrocarbons of Virgin Olive Oils Obtained from Several Olive Varieties.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44** : 1723-1726.
- (14) JIANG Z.Y., WOOLLARD A.C.S., WOLFF S.P.
Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe^{2+} in the Presence of Xylenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method.
Lipids, 1991, **26** : 853-856.
- (15) JIANG Z.Y., HUNT J.V., WOLFF S.P.
Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein.
Anal. Biochem., 1992, **202** : 384-389.
- (16) KALLEL M.
Etude analytique de l'insaponifiable d'une huile : Application à l'huile de noix.
Thèse d'Etat, ès-Science Pharmaceutique, Grenoble, 1981.

- (17) KARLESKIND A.
Manuel des corps gras.
Tec et Doc-Lavoisier, Paris, 1992.
- (18) KINTER M.
Analytical technologies for lipid oxidation products analysis
J. Chromatogr. B, 1995, **671** : 223-236.
- (19) LAROUSSE
Grand Dictionnaire Encyclopédique.
GDEL, Paris, 1984, 8723-8724.
- (20) LAVEDRINE F., RAVEL A., POUPARD A., ALARY J.
Effect of geographic origin, variety and storage on tocophérol concentrations in walnuts by HPLC.
Food chemistry, 97, **58** :1-2 : 135-140.
- (21) LAVEDRINE F.
Composition comparée de la noix de Grenoble (Variété Franquette) et de la noix de Californie (Variété Hartley). Intérêt nutritionnel de la noix de Grenoble.
Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble, 1997.
- (22) NOUROOZ-ZADEH J., TAJADDINI-SARMADI J., BIRLOUEZ-ARAGON I., WOLFF S.P.
Measurement of Hydroperoxides in Edible Oils Using the Ferrous Oxidation in Xylenol Orange Assay.
J. Agric. Food Chem., 1995, **43** : 17-21.
- (23) MOLL N. et M.
Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques.
Chimie et santé, Masson, Paris, 1980.
- (24) MULCHANDANI A., RUDOLPH D.C.
Amperometric Determination of Lipid Hydroperoxides.
Anal. Biochem., 1995, **225** : 277-282.

- (25) OISHI M., ONISHI K., NISHIJIMA M. *et al.*
Rapid and Simple Coulometric Measurements of Peroxide Value in Edible Oils and Fats.
JAOAC Int., 1992, *75* : 3 : 507-510.
- (26) OLIAS J.M., PERZ A.G., RIOS J.J., SANZ L.C.
Aroma of Virgin Olive Oil: Biogenesis of the "Green" Odor Notes
J. Agric. Food Chem., 1993, *41* : 2368-2373.
- (27) Pharmacopée Européenne,
Indice de peroxyde.
Pharmacopée Européenne, 1997 : 63.
- (28) POSSANZINI M., DIPALO V.
Determination of Olefinic Aldehydes and Other Volatile Carbonyls in Air Samples by, DNPH-coated cartridges and HPLC.
Chromatographia, 1995, *40* : 134-138.
- (29) RAVEL A., ROUSSEL A.M., BOITARD M., BERIEL H., DECOUX G., LATURAZE J.
Intérêt diététique de l'huile de noix. Etude expérimentale de son action sur la croissance et le métabolisme lipidique du rat.
Med. Nutr., 1980, *16* : 3 : 161-169.
- (30) RAVEL A.
Influence de l'huile de noix et du tourteau de noix sur la fonction plaquettaire. Corrélation avec les paramètres analytiques.
Thèse d'Etat, ès-Science Pharmaceutique, Grenoble, 1986.
- (31) RAVEL A., ROUSSEL A.M., BOITARD M., ALARY J.
L'huile de noix influence de la vitamine E et des acides gras polyinsaturés sur la fonction plaquettaire du rat.
Med. Nutr., 1987, *23* :3 : 161-165.
- (32) RIKHTER A.A
Oxidation of almond and walnut oils.
Plenum Publishing Corporation, 1981 : 446-450.

- (33) ROUSSEL A.M., RAVEL A., GROSLAMBERT P., BERIEL H. BOITARD M.
Intérêt diététique de l'huile de noix. Etude de son action sur la croissance et
l'évolution du métabolisme lipidique du lapin.
Med. Nutr., 1981, *17* : 2 : 107-121.
- (34) ROUSSEL A.M., RAVEL A., LATURAZE.J.
L'huile de noix : son action sur le cholestérol, l'athérosclérose et la thrombose
chez le rat.
108^{ème} Congrès National des Sociétés Savantes, Grenoble, Sciences, 1983, III :
285-292.
- (35) SHIRATSUCHI H., SHIMODA M., IMA YOSHI K., NODA K.,
OSAJIMA Y.
Volatile Flavor Compounds in Spray-Dried Skim Milk Powder.
J. Agric. Food Chem., 1994, *42* : 984-988.
- (36) WOLFF S.P.
Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange
for Measurement of Hydroperoxides.
Methods in Enzymol., 1994, *233* : 182-189.
- (37) WOLFF J.P.
Manuel d'analyse des corps gras.
Azoulay, Paris, 1968.
- (38) YAMAMOTO Y., FREI B., AMES B.N.
Assay of Lipid Hydroperoxides Using High-Performance Liquid
Chromatography with Isoluminal Chemiluminescence Detection.
Methods in Enzymol., 1990, *186* : 371-381.

Résumé

Notre objectif était d'évaluer l'évolution de la composition de l'huile de noix au cours de son stockage dans différentes conditions et notamment d'apprécier son rancissement. Pour cela, nous avons testé l'évolution des indices de carbonyle, d'acide et de peroxyde au cours du temps, à différentes températures, en présence ou non d'air et à l'abri ou non de la lumière.

Nous avons recherché par chromatographie en phase gazeuse les hydrocarbures de faible masse molaire qui se forment au cours du phénomène d'oxydation des huiles (en particulier l'hexane). Nous n'avons cependant pas pu le mettre en évidence dans nos échantillons.

L'indice de carbonyle, déterminé par titrimétrie, n'a pas donné de résultats homogènes.

Nous avons par contre nettement mis en évidence que les indices d'acide et de peroxyde varient non seulement en fonction de la température et de la durée de stockage, mais également par suite de l'exposition à la lumière et de la présence d'oxygène.

Pour l'évaluation des peroxydes, nous avons testé et comparé différentes méthodes : iodimétrique (indice de peroxyde), spectrophotométrique et ampérométrique. Cette dernière n'a pu fournir des résultats exploitables.

Nous avons également dosé par CLHP les tocophérols présents dans l'huile de noix. Puis nous avons surchargé l'huile analysée avec les isomères α et γ , que nous avons mis en évidence par la technique de CLHP.

Nous n'avons pu, après un an de stockage, mettre en évidence à l'aide de l'indice de peroxyde, l'amélioration de la stabilité de l'huile, que celle-ci soit additionnée ou non d' α ou de γ tocophérol.

Ces résultats montrent bien qu'il est nécessaire de stocker l'huile de noix à l'abri de la lumière et de l'oxygène de l'air.

Mots-Clés : Huile de noix, Rancissement, Peroxydes, Carbonyles, Tocophérols, Acidités, Hydrocarbures, Conservation.