

73

ROYAUME DU MAROC

SPECIAL OLIVIER



AL AWAMIA

REVUE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE MAROCAINE



Institut National de la Recherche Agronomique
Rabat

NOVEMBRE 1990

SOMMAIRE

PAGES

Mise au point d'une méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour la détermination des pigments chlorophylliens dans les huiles végétales par M. RAHMANI

Mise au point sur le rôle des pigments chlorophylliens dans la photo-oxydation de l'huile d'olive vierge par M. RAHMANI

Aptitude des olives à la conservation par M. BELLAJI

Contribution du laboratoire officiel d'analyse et de recherches chimiques de Casablanca à la promotion de la qualité de l'huile d'olive au Maroc par SOULHI A.

Facteurs chimiques et physiques contrôlant la multiplication in-vitro de l'olivier (OLEA EUROPEAEL). C.V. PICHOLINE MAROCAINE. Par WALALI LOUDYI DOU EL MACANE

Prévision des récoltes d'olive dans la région de Marrakech à partir de l'analyse du contenu pollinique de l'atmosphère par ABDELKADER ABID

Etudes des caractères morphologiques, physiologiques et biologie florale de deux variétés d'olivier (dahbia et picholine marocaine) dans la région de Meknès

Contribution à l'étude du cycle biologique de phloetribus scarabioides BERN (Col scolydae) dans la région de Taroudant (Maroc) par A. BENZOUN

Instruction aux auteurs

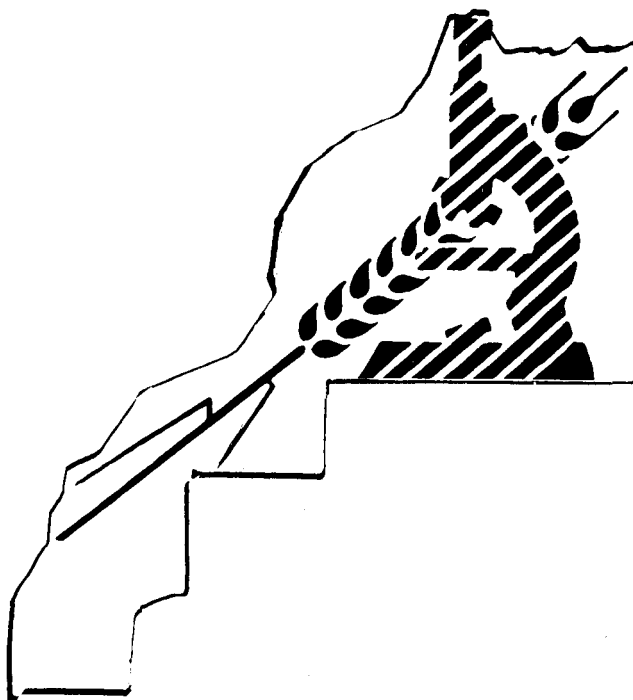
ROYAUME DU MAROC

73

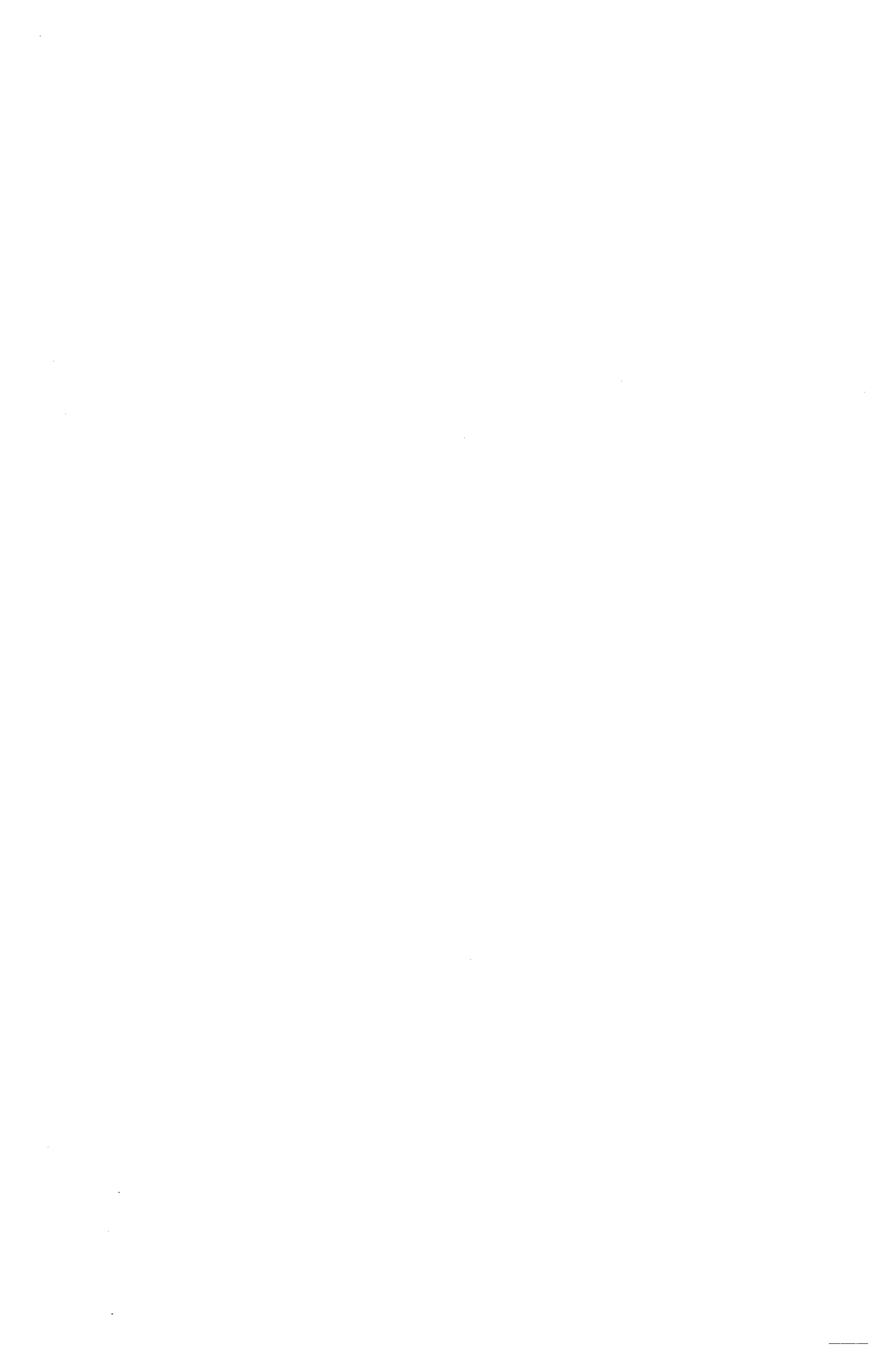


AL AWAMIA

REVUE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE MAROCAINE



Institut National de la Recherche Agronomique Rabat



MISE AU POINT D'UNE METHODE DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (CLHP) POUR LA DETERMINATION DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS DANS LES HUILES VEGETALES *

M. RAHMANI * et A. SAARI CSALLANY **

I - INTRODUCTION

Les pigments végétaux ou leurs produits de dégradation sont responsables de la coloration spécifique des huiles végétales. Les pigments verts contenus dans les huiles sont les chlorophylles a et b et leurs produits de dégradation, les phéophytines a et b. La teneur des huiles végétales en chlorophylles et phéophytines dépend du mode utilisé pour l'extraction de l'huile, du degré de maturité des graines ou fruits, etc.

* Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II
Section de Technologie Alimentaire - BP. 6202.
Rabat - Instituts (Maroc)

** University of Minnesota, Department of Food
Science and Nutrition
1334 Eckles Avenue, St- Paul, Minnesota
55 108 (USA) RFCG 85 - 27

Les chlorophylles et les phéophytines sont des agents photosensibilisateurs (1,2). En présence de lumière et d'oxygène à l'état fondamental (3o_2), ces pigments induisent la formation d'oxygène singulet (1o_2) qui est une espèce 1 500 fois plus réactive envers les lipides insaturés que l'oxygène à l'état fondamental (3). La décomposition ultérieure des hydroperoxydes formés par l'action de l'oxygène singulet sur les lipides insaturés produit les radicaux libres nécessaires à l'initiation du processus d'autoxydation (3,4).

Une coloration verdâtre des huiles végétales peut être traditionnellement acceptée (huile d'olive vierge) mais pour la majorité des huiles végétales, un pourcentage excessif de chlorophylles est indésirable vu les difficultés de décoloration lors du raffinage (5, 6).

La méthode adoptée par l'AACS (American Oil Chemists' Society) comme méthode standard pour la détermination des chlorophylles dans les huiles végétales consiste à mesurer l'absorption à 670 nm d'un échantillon d'huile (7). Cependant, cette méthode a l'inconvénient de ne pas distinguer entre les pigments isomères, car les chlorophylles a et b d'une part et les phéophytines a et b d'autre part ont toutes un maximum d'absorption voisin de 670 nm (6).

De plus, la méthode officielle ne peut être appliquée aux huiles hydrogénées ou désodorisées car l'absorption des chlorophylles à 670 nm est très faible dans ces huiles (7). Le but de cette étude est de développer une méthode pour séparer les chlorophylles et phéophytines par CLHP et de suivre les changements quantitatifs des pigments verts après décoloration et stockage des huiles végétales.

MATERIELS ET METHODES

1. Séparation par CLHP

La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne μ - Porasil ($10\ \mu\text{m}$) ; $3,9\ \text{mm} \times 30\ \text{cm}$ (Waters Assoc.) avec une phase mobile composée de 1,5 % d'isopropanol dans l'hexane et un débit de $0,8\ \text{ml} / \text{min}$.

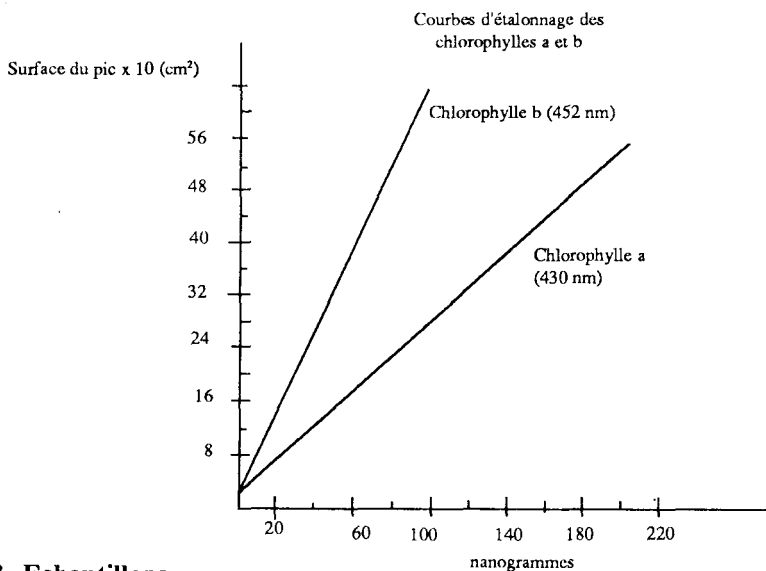
Une pompe Altex, modèle 110 A (Beckman Instruments, Berkeley, Calif.) a été utilisée. La détection a été effectuée par un spectrophotomètre Beckman, modèle 165, équipé d'une cellule à quartz de capacité $9\ \mu\text{l}$.

La séparation par CLHP des quatre pigments chlorophylliens ainsi que du β - carotène est montrée dans la figure 3.

2. Standards

Les standards de chlorophylle a et b ont été achetés auprès de Sigma co. (St - Louis, Missouri) et utilisés dès leur réception. Les phéophytines a et b ont été préparées à partir des chlorophylles correspondantes selon la méthode décrite par Schwartz et Von Elbe (8). Les spectres visibles des phéophytines ainsi préparées étaient identiques à ceux de phéophytines pures reportés dans la littérature (9). Les chlorophylles et phéophytines standards ont été ensuite diluées dans une solution d'hexane à 1,5 % d'isopropanol de façon à avoir des concentrations allant de 20,2 à 0,218 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Cette gamme de concentrations couvre largement les teneurs moyennes habituelles des pigments verts dans les huiles végétales. Des courbes standards ont été établies à 430 nm pour la chlorophylle a, 452 nm pour la chlorophylle b (Fig. 1), 409 nm pour la phéophytine a et 433 nm pour la phéophytine b (Fig. 2). Les spectres visibles de chaque pigment, en solution dans la phase mobile, ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU - 8.

Figure 1 : Courbes d'étalonnage des chlorophylles a et b



3. Echantillons

Des échantillons commerciaux d'huile d'olive vierge et de soja ont été analysés.

L'échantillon d'huile (5 grammes) est pesé dans une fiole jaugée de 100 ml. Le volume est amené à 100 ml par addition d'une solution d'hexane à 1,5 % d'isopropanol. Des injections de 100 μl sont effectuées dans la colonne.

Etudes de récupération :

Une technique standard d'enrichissement a été utilisée afin de déterminer l'influence du support huileux sur le dosage quantitatif des chlorophylles et des phéophytines.

Une solution d'huile d'olive vierge a été enrichie avec des quantités connues de chlorophylles a et b et de phéophytines a et b. La détermination des chlorophylles et phéophytines dans l'huile enrichie a été effectuée de la même façon que dans l'huile non enrichie. Le pourcentage de récupération des chlorophylles et phéophytines a été déterminé comme suit :

$$\% \text{ récupération} = (C / (A + B)) \times 100$$

où C = μgs de l'isomère de chlorophylle ou phéophytine trouvés dans l'échantillon enrichi.

B = μgs de l'isomère de chlorophylle ou phéophytine ajoutés à l'échantillon.

A = μgs de l'isomère de chlorophylle ou phéophytine trouvés dans l'échantillon non enrichi.

Régénération de la colonne :

La colonne a été régénérée périodiquement avec environ 50 ml de méthanol à un débit de 2 ml/min. La phase mobile est ensuite pompée dans la colonne pendant 30 min. avant le début des analyses.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

Les quatre pigments chlorophylliens ainsi que le β -carotène sont séparés qualitativement à 430 nm par CLHP (Fig. 3).

La meilleure sensibilité de détection est obtenue à 430 nm pour la chlorophylle a, à 452 nm pour la chlorophylle b, à 409 nm pour la phéophytine a et à 433 nm pour la phéophytine b.

Le dosage quantitatif des chlorophylles et phéophytines dans les échantillons d'huile est effectué par intégration manuelle des pics chromatographiques et comparaison avec la courbe d'étalonnage appropriée.

Les résultats des études de récupération sont donnés dans le tableau 1.

La reproductibilité de cette méthode est bonne avec des déviations relatives standards inférieures à 2,1 % dans la plupart des cas. Cette méthode est sensible à 0,01 µg de chlorophylle a ou b et à 0,02 µg de phéophytine a ou b par injection.

Les huiles analysées contenaient uniquement de la phéophytine a et b (tableau II). Ces huiles étaient achetées dans le commerce sans aucune information sur la date, ni sur le mode d'extraction, ni sur la durée de stockage.

Tableau I : Etudes de récupération des chlorophylles et phéophytines (injections de 100 µl)

Echantillon	chloro- phylle a (µg / ml)	chloro- phylle b (µg / ml)	phéophy- tine a (µg / ml)	phéophy- tine b (µg / ml)
Huile d'olive vierge dans la phase mobile (53,7 mg / ml)	ND	ND	0,08	ND
Solution standard ajoutée	0,218	0,484	0,808	1,0
Solution d'huile enrichie	0,226	0,481	0,867	0,978
	0,204	0,466	0,867	0,986
	0,218	0,474	0,916	0,986
moyennes	0,216	0,474	0,883	0,983
% récupération	99,1 %	97,9 %	99,4 %	98,3 %

Les valeurs encadrées sont des moyennes.
(ND) Non détecté.

Figure 2 : Courbes d'étalonnage des phéophytines a et b

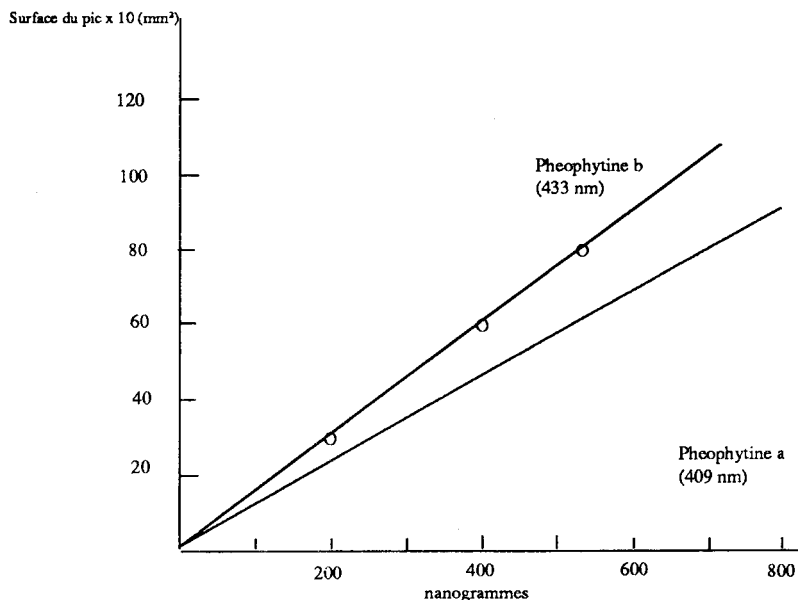


Tableau II : Détermination par CLHP des chlorophylles et phéophytines dans l'huile d'olive vierge et l'huile de soja

Echantillon	Chlorophylle a (µg / g)	Chlorophylle b (µg / g)	Phéophytine a (µg / g)	Phéophytine b (µg / g)
Huile d'olive vierge	ND	ND	1, 5	ND
Huile de soja	ND	ND	traces	ND

(moyenne de deux déterminations)

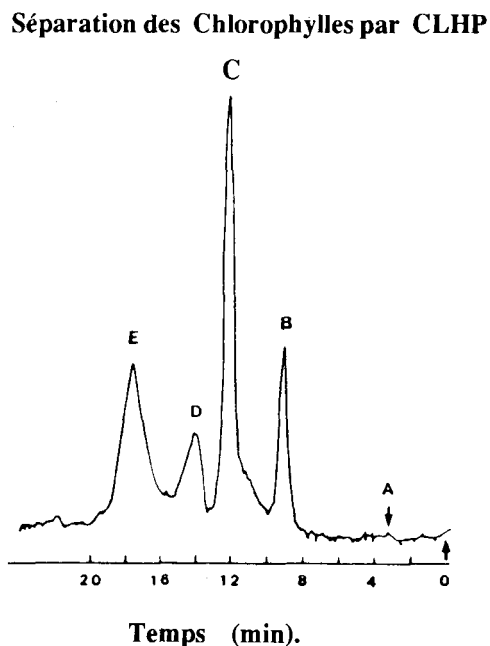
(ND) Non détecté

Cette méthode peut être appliquée en un temps relativement court (20 min), et de ce fait convient très bien pour la détermination de l'efficacité de la décoloration en cours du raffinage, ou encore, pour classer les graines oléagineuses selon leur degré de maturité (i. e. graines de colza).

Enfin, la technique permet une bonne séparation des 4 pigments et du β - carotène et de ce fait peut trouver des applications pour la prédiction de la stabilité des huiles végétales vis-à- vis de la photooxydation.

le β - carotène est un puissant désactivant de l'oxygène singulet. Dans les huiles végétales, une faible teneur en β -carotène permet de réduire considérablement l'intensité de la photooxydation (2).

Figure 3 = Séparation des chlorophylles a et b, phéophytines a et b, et β -carotène



A = β -carotène

D = phéophytine b

B = phéophytine a

E = chlorophylle b

C = chlorophylle a

RESUME

Une méthode rapide et sensible a été mise au point pour la détermination quantitative des chlorophylles a et b ainsi que de leurs produits de dégradation, les phéophytines a et b, dans les huiles végétales. L'échantillon d'huile est dilué vingt fois (w/v) avec le mélange de solvants hexane-isopropanol (98,5 : 1,5), puis injecté directement sur une colonne micro-Porasil. La phase mobile utilisée est un mélange de solvants hexane-isopropanol (98,5 : 1,5). Les quatre pigments, ainsi que le β -carotène, sont séparés qualitativement à 430 nm. Un dosage quantitatif est obtenu à 430 nm pour la chlorophylle a ; 452 nm pour la chlorophylle b, 409 nm pour la phéophytine a et 433 nm pour la phéophytine b. Ces longueurs d'onde correspondent aux maxima d'absorption des pigments dans la phase mobile. Les taux de récupération moyens des divers pigments ajoutés individuellement à des échantillons commerciaux d'huile d'olive vierge varient entre 99,4 % (Phéophytine a) et 97,9 % (chlorophylle b). La méthode est sensible à 0,01 microgramme de chlorophylle a ou b et à 0,02 microgramme de phéophytine a ou b par injection.

ABSTRACT

A rapid and precise method has been developed for determining the chlorophylls a and b and so their degradation products, the pheophytins a and b, in vegetable oils. The oil - sample is diluted twenty times (w/v) with the solvent mixture, hexane - isopropanol (98,5 : 1,5), then injected directly on a column μ - Porasil. The used mobile phase is a solvent mixture hexane - isopropanol (98,5 : 1,5). The 4 pigments and β -caroten are qualitatively separated at 430 nm. A quantitative determination is obtained at 430 nm for chlorophyll a : 452 nm for chlorophyll b, 409 nm for pheophytin a and 432 nm for pheophytin b. These wave - lengths correspond with absorption maximum of pigments in the mobile phase. The average recovery rates of different pigments added individually to samples of virgin olive oil vary between 99,4 % (pheophytine a) and 97,9 % (chlorophyll b). The method is precise at 0,01 μ g of chlorophyll a or b and at 0,02 μ g of pheophytin a or b by injection.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) D. J. CARLSSON, T. SUPRUNCHUK et T. WILES : J. amer. Oil Chem. Soc., 53, 1976, 656.
- (2) E. N. FRANKEL, W. E. NEFF et T. R. BESSLER : Lipids, 14, 1979, 961.
- (3) H. R. RAWLS et P. J. VAN SANTEN : Ann. New-york Acad. Sci., 171, 1970, 1.
- (4) E. N. FRANKEL : Prog. Lipid Res., 19, 1980, 1.
- (5) J. K. DAUN : J. amer. Oil Chem. Soc., 53, 1976, 768.
- (6) J. K. DAUN : J. amer. Oil Chem. Soc., 59, 1982, 15.
- (7) AOCS : Official and tentative Methods of the American Oil Chemists Society, 4e édition, Champaign, Illinois, USA.
- (8) S. J. SCHWARTZ et J. H. VON ELBE : J. Food Sci., 48, 1983, 1303.
- (9) L.P. VERNON et G. R. SEELY : The chlorophylls, New york, Academic Press, 1966.