

Utilisation du Retention Time Locking (calage des temps de rétention) sur un GC Agilent 8890 afin de garantir la conformité du système pour l'analyse des FAME *cis-trans* selon AOAC 2012.13

Auteur

Rachael Ciotti
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

La méthode AOAC 2012.13 détermine la teneur en acides gras dans les produits laitiers et le lait maternisé par chromatographie en phase gazeuse capillaire et détection par ionisation de flamme. Cette méthode a été appliquée sur un GC Agilent 8890 équipé d'une colonne CP-Sil 88 de 100 m pour analyser un mélange de 37 esters méthyliques d'acides gras, ainsi que pour déterminer l'efficacité de séparation des acides oléique, linoléique et linoléique à l'aide de 19 isomères *cis-trans* C18 mono- et polyinsaturés. La résolution pour les principales paires critiques de FAME *cis* et *trans* a été évaluée à l'aide d'un étalon qualitatif. Enfin, le calage des temps de rétention (RTL) a aussi été mis en œuvre pour supprimer la nécessité du réaligement après une maintenance de colonne.

Introduction

Les matières grasses laitières et végétales contiennent des triglycérides, c'est-à-dire des esters de glycérol lié à trois acides gras. Les acides gras sont constitués d'un groupe carboxyle terminal lié à une chaîne hydrocarbonée qui peut être courte ou longue, linéaire ou ramifiée, ainsi que saturée, mono- ou polyinsaturée. La configuration et la position de la double liaison dans les matières grasinsaturées se traduisent par de nombreux isomères *cis-trans*, mais aussi de position. L'identification précise de ces isomères est essentielle pour l'étiquetage nutritionnel.

Il est difficile de séparer et d'identifier les acides gras homologues et isomères à partir d'une matrice complexe. Après estérification, les esters méthyliques d'acides gras (FAME) correspondants peuvent être analysés de façon reproductible par chromatographie en phase gazeuse et détection par ionisation de flamme. L'ordre d'éluion et l'efficacité de séparation des isomères dépendent grandement de la longueur de la colonne et du type de phase stationnaire. Bien qu'aucune colonne ne puisse entièrement séparer le large éventail d'isomères *cis-trans* de FAME, une colonne capillaire de 100 m avec une phase stationnaire cyanopropyle hautement polaire telle que CP-Sil 88 permet la séparation fiable et détaillée de la plupart des isomères *cis* et *trans* des FAME. Contrairement aux séparations sur colonnes WAX traditionnelles, les isomères *trans* sont élués avant les isomères *cis* sur la phase stationnaire cyanopropyle hautement polaire.

Données expérimentales

Un chromatographe en phase gazeuse Agilent 8890 équipé d'un injecteur split/splitless (SSL), d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un passeur automatique Agilent 7693A (ALS) a été utilisé pour les analyses.

Produits chimiques

Des étalons analytiques ont été achetés pour évaluer les performances de séparation des FAME :

- Un mélange de 37 FAME (47885-U) contenant des FAME de C4 à C24 dans une plage de concentration de 100 à 600 µg/mL
- Un mélange de quatre esters méthyliques *cis-trans* de l'acide linoléique (CRM47791) avec une concentration totale de 10 mg/mL

- Un mélange de huit isomères d'esters méthyliques de l'acide linoléique (L6031) contenant entre 3 et 30 % (en poids) de chaque composant
- Un mélange de FAME *cis-trans* (40495-U) pour la vérification des performances de la colonne contenant différents FAME à 2,5 mg/mL

Tous ces mélanges ont été achetés auprès de MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA). Un mélange de huit FAME *cis-trans* (35079) a été acheté auprès de Restek (Bellefonte, PA, USA).

Tableau 1. Paramètres de l'instrument.

Paramètres du GC Agilent 8890 pour la méthode AOAC 2012.13 officielle	
Injection	
Taille de seringue	10 µL, réf. G4513-80204
Volume d'injection	1 µL
Injecteur	SSL, mode split
Température	250 °C
Rapport de division	10:1
Débit de purge de septum	3 mL/min
Colonne	Agilent CP-Sil 88, réf. CP7489
Dimensions	100 m × 0,25 mm, 0,20 µm
Gaz vecteur	He, 0,8 mL/min, débit constant
Four	
Température initiale	60 °C
Palier initial	5 minutes
Montée en température	15 °C/min jusqu'à 165 °C, palier de 1 minute 2 °C/min jusqu'à 225 °C, palier de 20 minutes
Détecteur	
Type	FID
Température	250 °C
Débit d'air	400 mL/min
Débit de H ₂ (combustible)	40 mL/min
Débit de N ₂ (gaz d'appoint)	25 mL/min

Résultats et discussion

Pour évaluer la séparation sur toute la gamme (figure 1), un mélange de 37 FAME entre C4:0 et C24:0 dans le dichlorométhane a été injecté. La consigne de température de 60 °C du four et la durée du palier initial ont permis la séparation du pic de solvant de celui du C4:0 qui est un indicateur important de la qualité du lait. Le programme de température du four a permis la séparation efficace des isomères *cis-trans* et des FAME polyinsaturés à longue chaîne, à l'exception des pics du C23:0 et du C20:4n6 qui sont coélus à 48 minutes environ. Toutefois cela n'est pas un problème, car, le C23:0 n'est habituellement pas présent dans les produits laitiers.

Une séparation détaillée des isomères *cis-trans* a été évaluée à l'aide de mélanges étalon de référence du commerce. Le mélange de Restek contenant huit FAME *cis-trans* dans le dichlorométhane a été dilué d'un facteur 20 dans le dichlorométhane et injecté dans le GC. Cette méthode a permis la résolution de six isomères *cis-trans* de FAME C18:1 (figure 2).

Malgré la présence d'une légère coélution des isomères *trans*, le groupe est bien séparé des isomères *cis*-C18 mono-insaturés, ce qui est nécessaire puisque les acides gras *trans* sont rapportés dans un groupe de la méthode AOAC 2012.13 officielle.

Afin de caractériser la séparation des isomères C18:2, un mélange de FAME esters méthyliques de l'acide linoléique dans le dichlorométhane (MilliporeSigma CRM47791) a été dilué à une concentration finale de 500 mg/L. La figure 3 démontre que chacun des isomères de FAME linoléiques a été bien séparé.

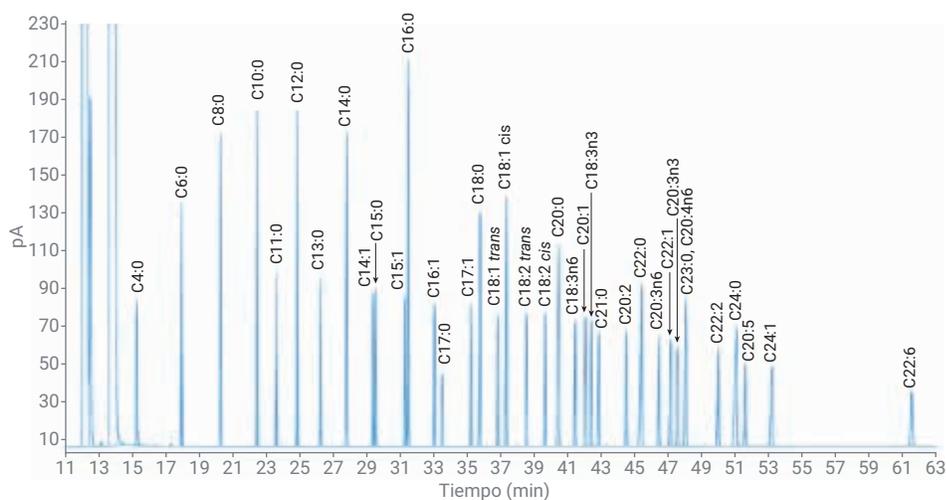


Figure 1. Chromatogramme de 37 esters méthyliques d'acides gras.

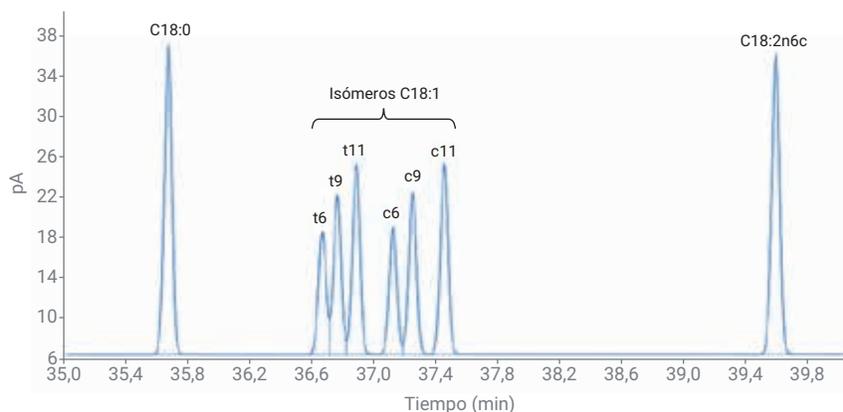


Figure 2. Agrandissement du chromatogramme des isomères C18:1 obtenu selon AOAC 2012.13.

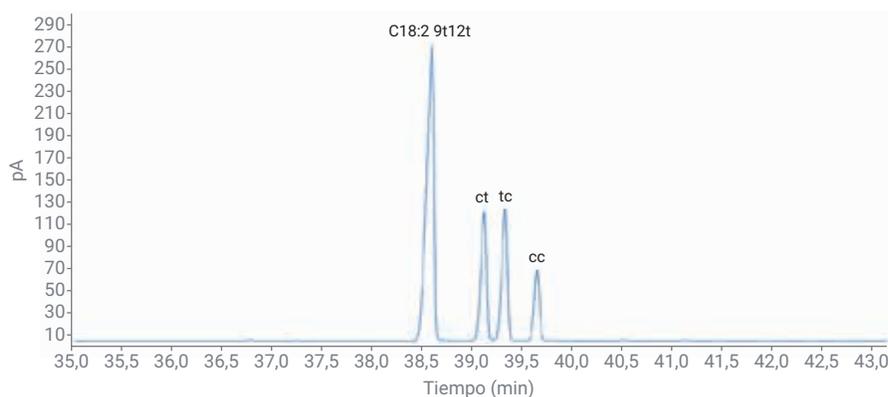


Figure 3. Agrandissement du chromatogramme des isomères C18:2 obtenu selon la méthode AOAC 2012.13.

Finalement, les performances de la méthode pour les isomères C18:3 ont été examinées en injectant un mélange d'esters méthyliques de l'acide linoléique (MilliporeSigma L6031) dilué à 2,5 mg/mL dans le dichlorométhane (figure 4). Aucune colonne ne peut complètement séparer les isomères de l'acide linoléique ; cependant, à des fins d'étiquetage nutritionnel, les isomères *trans* sont bien séparés des esters méthyliques de l'acide *alpha*-linoléique.

La méthode AOAC 2012.13 requiert la vérification des performances avant l'étalonnage. La résolution est évaluée pour les pics *trans*-C18:1n13t/C18:1n14t et *cis*-C18:1n9c/C18:1n10c (agrandissement en encart dans la figure 5). En utilisant l'équation 1, une résolution est considérée comme acceptable quand la valeur R calculée est égale ou supérieure à 1,00. Cinq réplicats d'un mélange de FAME *cis-trans* pour la vérification des performances qualitatives de la colonne (MilliporeSigma 40495-U) ont été injectés afin d'évaluer la résolution et la reproductibilité des aires/temps de rétention.

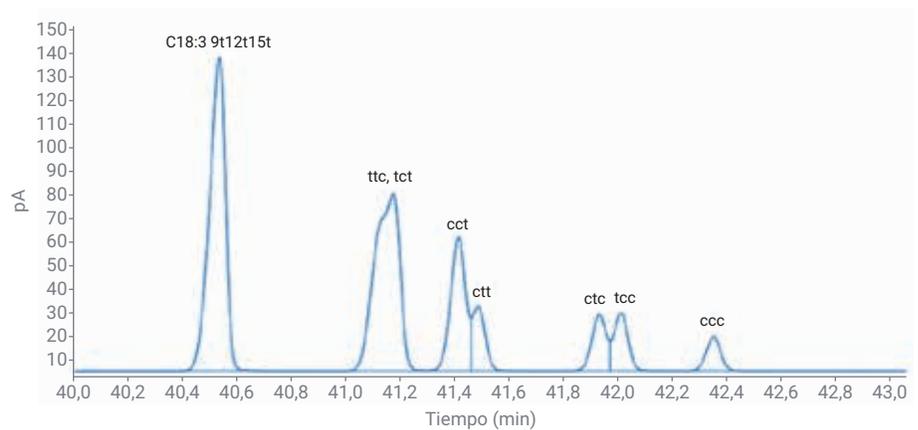


Figure 4. Agrandissement du chromatogramme montrant la résolution obtenue pour les isomères C18:3 en appliquant la méthode AOAC 2012.13.

$$R = 1,18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0,5h1} + W_{0,5h2}} \right)$$

Équation 1. Résolution des pics à mi-hauteur.

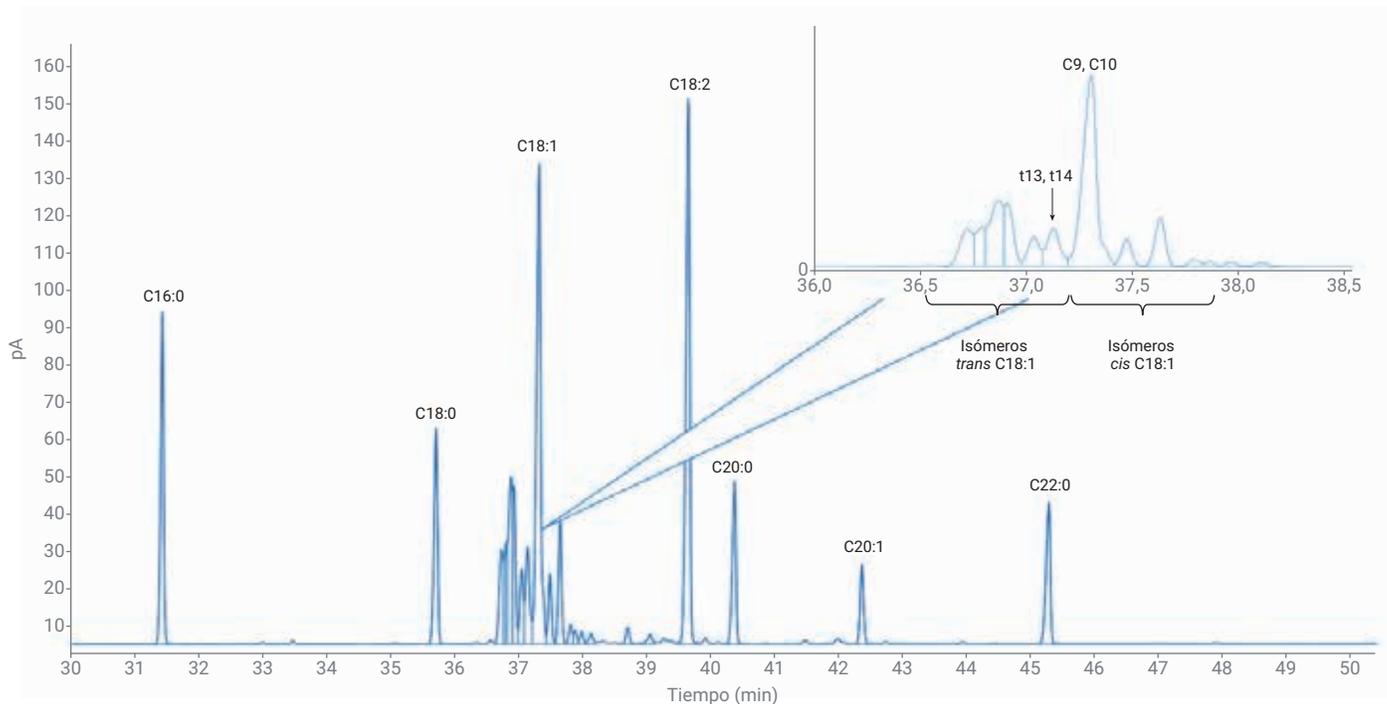


Figure 5. Agrandissement du chromatogramme du mélange étalon des performances qualitatives de la colonne.

Le tableau 2 récapitule les résultats pour les paires critiques utilisées dans la vérification de la résolution : la reproductibilité des temps de rétention était excellente pour les deux isomères avec un écart-type relatif (RSD) de 0,007 %. La précision des aires des pics correspondait à un RSD de moins de 2,5 % pour chaque isomère. La résolution moyenne de 1,494 des pics à mi-hauteur dépassait l'exigence de résolution minimale de la méthode.

Calage des temps de rétention

Le mélange de FAME déterminés par la méthode AOAC 2012.13 requiert une température et un débit précis pour permettre une identification correcte ; il représente donc un candidat excellent pour le RTL. La fonction RTL d'Agilent offre une reproductibilité à long terme sur un instrument donné et supprime la nécessité d'ajuster les temps de rétention après une maintenance de la colonne. Elle est capable de maintenir les mêmes temps de rétention après l'implémentation de la méthode sur un autre GC, simplifiant le transfert de méthode et les comparaisons interlaboratoires. La fonction RTL fait correspondre et cale les temps de rétention pour un composé défini en étudiant la relation entre les paramètres de l'injecteur et le temps de rétention au cours d'une série d'analyses de référence, en étalonnant le système à partir des résultats et en enregistrant cette relation dans un fichier de méthode.

L'acquisition dans OpenLab CDS Agilent version 2 comprend un assistant RTL qui guide l'opérateur tout au long du processus en sélectionnant une méthode d'acquisition pour le calage, ainsi qu'un composé cible choisi dans un fichier de données acquises précédemment. L'assistant RTL configure ensuite une série d'analyses d'étalonnage de la pression en fonction des paramètres spécifiés dans la méthode d'acquisition. Une analyse est effectuée à l'aide de la consigne de pression d'origine et deux analyses sont réalisées avec un écart de pression de respectivement 15 %

au-dessus ou en dessous de la consigne de la méthode. L'écart dans les consignes de pression simule les modifications de la longueur de la colonne qui se produisent couramment après une maintenance, par exemple après un raccourcissement de colonne. Les méthodes calées ne nécessitent pas de réalignement des temps de rétention après la maintenance ou le remplacement de la colonne ;

au lieu de cela, les temps de rétention d'origine de l'instrument peuvent être adaptés par l'intermédiaire d'un simple étalon de recalage. Si l'étalon de recalage sert également d'étalon d'évaluation des performances de la colonne, les utilisateurs peuvent satisfaire aux exigences d'évaluation des performances spécifiées par la méthode AOAC 2012.13 en une seule étape.

Tableau 2. Résultats des injections de cinq réplicats d'un mélange étalon de FAME pour la vérification des performances qualitatives de la colonne.

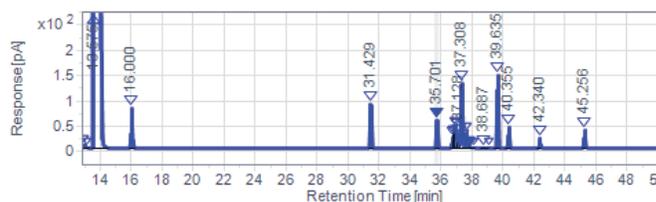
Valeur	Description	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Rép. 5	RSD
t_{R1}	Temps de rétention 1 en min, pic t13/t14	37,124	37,125	37,128	37,128	37,13	0,007 %
t_{R2}	Temps de rétention 2 en min, pic c9/c10	37,304	37,305	37,308	37,308	37,31	0,007 %
	Aire du pic t13/t14	115,605	113,463	117,747	115,944	120,812	2,356 %
	Aire du pic c9/c10	599,259	588,91	610,828	602,276	628,644	2,458 %
$W_{0,5N1}$	Largeur à mi-hauteur du pic t13/t14	0,073	0,072	0,073	0,073	0,074	0,969 %
$W_{0,5N2}$	Largeur à mi-hauteur du pic c9/c10	0,069	0,069	0,069	0,069	0,07	0,646 %
R	Résolution des pics à mi-hauteur	1,496	1,506	1,496	1,496	1,475	0,77 %

To complete the RTL calibration, the wizard will perform three runs. The first run is completed at a flow/pressure lower than the method setpoint, the second run is completed at the flow/pressure in the method, and the third run is completed at a higher flow/pressure than the method setpoint. Specify the pressure change for runs 1 and 3, and specify the sample vials for each of the runs. For liquid samples, this can be the same vial. For headspace samples, prepare three separate vials.

Run #	% Change in Pressure	Pressure	Vial Number
1	- 15%	21.673 psi	107
2		25.498 psi	107
3	+ 15%	29.323 psi	107

Injection Source: GC Injector - Front

From the chromatogram or table below, please select the retention time of your locking compound. If you wish to set that retention time to a specific value, please enter that in the "Targeted Retention Time" box.



Targeted Retention Time: 35.701 min

Targeted Compound Name: C18:0

Peak Number	Compound Name	Retention Time	Area
7	C18:0	35.7009	229.6815
8	C18:1n6t	36.7209	113.8100
9	C18:1n9t	36.7966	77.3611
10	C18:1n11t	36.8657	202.8851
11		36.9096	129.4210
12		37.0250	89.2177

Figure 6. Écran de configuration de l'assistant de calage des temps de rétention.

Le mélange étalon de FAME *cis-trans* pour l'évaluation des performances de la colonne a été utilisé pour le calage des temps de rétention de la méthode. Une méthode d'acquisition, une méthode de traitement et un fichier de résultats traités provenant d'une acquisition précédente du mélange étalon de vérification des performances ont été sélectionnés. C18:0 a été choisi comme composé cible pour le RTL. Comme le montre la figure 6, l'assistant RTL a guidé le processus d'étalonnage de la pression à l'aide du pic C18:0 avec un temps de rétention cible de 35,701 minutes. La courbe d'étalonnage de la pression obtenue pour la série de trois analyses programmées automatiquement par l'assistant RTL présentait une corrélation excellente (figure 7). La méthode analytique a ensuite été calée à la pression indiquée de 25,498 psi, puis une opération de maintenance de colonne a été effectuée en coupant environ 0,5 m à partir de la tête de colonne CP-Sil 88 de 100 m.

Afin d'évaluer l'ampleur de la perte de rétention due à la modification de la longueur de la colonne, le mélange étalon

de FAME *cis-trans* pour la vérification des performances de la colonne a été réanalysé après la maintenance ; le temps de rétention du pic cible C18:0 a été avancé de 0,232 minute. Si le calage des temps de rétention n'avait pas été effectué, l'opérateur aurait dû analyser le mélange étalon contenant tout l'éventail de FAME désirés et ressaisir manuellement les temps de rétention des composés dans la méthode de traitement des données.

Au lieu de ressaisir manuellement les nouveaux temps de rétention des composés, la méthode analytique a été de nouveau calée à l'aide de l'assistant RTL et une nouvelle consigne de pression de 25,253 psi a été configurée. Cette nouvelle consigne de pression tient compte du changement de longueur de la colonne pour établir les temps de

rétention, accélérant ainsi la préparation du système pour l'analyse. Le mélange étalon de FAME *cis-trans* pour la vérification des performances de la colonne a été réinjecté afin de vérifier que les nouvelles consignes de pression permettaient d'obtenir les temps de rétention prévus. La figure 8 présente un résumé des résultats ainsi qu'une superposition des chromatogrammes. Les temps de rétention recalés après le raccourcissement de la colonne correspondaient étroitement aux temps de rétention d'origine, avec des différences comprises entre 0,000 et 0,009 minute pour chacun des composés principaux analysés avec la colonne de 100 m. Notez le nouveau temps de rétention de 35,700 pour C18:0 comparé au temps de rétention initial de 35,701 minutes, soit une différence relative de 0,0028 %.



Figure 7. Résultats de l'étalonnage de la pression pour le calage des temps de rétention.

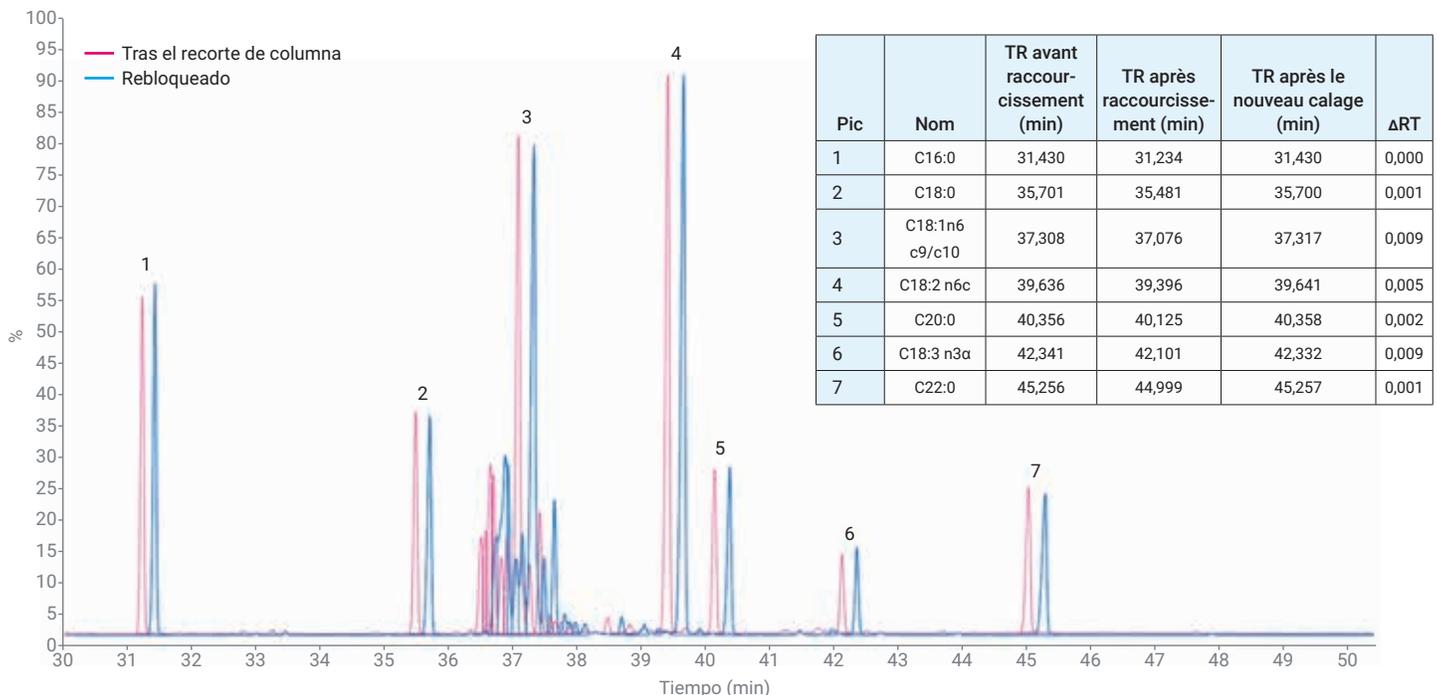


Figure 8. Résultats et agrandissement de la superposition des chromatogrammes du mélange étalon de vérification des performances de la colonne avant et après le nouveau calage.

Conclusion

La séparation des isomères de FAME à l'aide d'une colonne Agilent CP-Sil 88 de 100 m sur un GC Agilent 8890 présentait une résolution dépassant les exigences minimales d'évaluation des performances spécifiées dans la méthode AOAC 2012.13. La reproductibilité s'est avérée excellente pour l'injection d'un mélange étalon de FAME spécifique à la vérification des performances de la colonne, avec des RSD des temps de rétention de 0,007 % pour deux isomères C18 clés. Enfin, l'utilisation d'un mélange étalon de vérification des performances de la colonne associée à la fonction unique RTL d'Agilent a permis d'identifier correctement les isomères de FAME, de rendre l'instrument plus rapidement opérationnel après une maintenance et de simplifier les comparaisons des résultats d'un laboratoire à l'autre.

Références

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-3760EN, **2005**.
3. Zou, Y.; Wu, H. Améliorez l'analyse de 37 esters méthyliques d'acide gras. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8706FR, **2018**.

www.agilent.com/chem

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Imprimé aux États-Unis, le 15 novembre 2019
5994-1184FR

