

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID DE TLEMCCEN

Faculté des Sciences  
Département de Chimie

Laboratoire de recherche de Spectrochimie et Pharmacologie  
Structurale

## Mémoire

Post-Graduation de *Magister en Chimie*  
*Option : Spectrochimie et Méthodes d'Analyse*

### Thème

Détermination des antioxydants des huiles d'olives (N.W  
Algérie)

Présenté par: M<sup>r</sup> Amcha Abdelkader

Soutenu le 12/12/2012

#### Composition du jury

Mr MANSRI Ali	Président de jury	professeur	U. A. B. Tlemcen
Mr BENSAOULA Abdelhakim	Examineur	Maître de conférences	U. A. B. Tlemcen
Mr MASSEN Zoheir	Examineur	Professeur	U. A. B. Tlemcen
Mr DAHMANI Benamar	Encadreur	Professeur	U. A. B. Tlemcen

Année Universitaire 2011/2012

*Dédicace*

*A mes parentes*

*A ma famé*

*A mes frères*

*A mes sœurs*

*A toutes ma famille.*

*A mes amis*

*Remerciements*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche en Spectrochimie et Pharmacologie Structurale à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen sous la direction du professeur DAHMANI Benamar. Je tiens ici à lui exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde reconnaissance pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail dans un environnement aussi enrichissant tant sur le plan scientifique que personnel.

Je tiens aussi à remercier vivement M<sup>r</sup> Rachid LAOUER pour sa permanente disponibilité, la pertinence et la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mené. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance la plus sincère.

Je tiens à remercier également l'ensemble des membres de mon jury, Mr Mansri ali en tant que président de jury, Mr Bensaoula abdelhakim et Mr MASSEN Zoheir pour avoir mobilisé de leur temps pour examiner et juger ce travail, en tant qu'examineurs.

Enfin, au – delà du laboratoire, il y a la vraie vie. Les connaissances, les amis , la famille, qui ont tous, sans en être nécessairement conscients, joué à leur échelle un rôle important et rendu cette période fort supportable. J'en viens à remercier les personnes qui ont fait un travail de fond, tellement important: mon père, ma mère, mes frères et sœurs. Je leurs dédie ce travail et les remercie sincèrement pour le soutien sans faille et l'affection qu'ils m'ont accordés durant cette période (qui a dû leur sembler bien longue...).

*Bref, un grand mercitous...  
Amcha Aek*

# Sommaire

<b>Introduction générale</b>	1
<b>CHAPITRE I : Bibliographie</b>	4
<b>I.1 Olivier et huile d'olive</b>	5
<b>I.1.1 Généralité</b>	5
<b>I.2 .Production d'huile d'olive</b>	5
<b>I.2.1. De l'olivier à l'huile d'olive</b>	5
<b>I.3.L'huile d'olive</b>	8
I.3.1.Techniques de transformation de l'olive	9
I. 3.1.1.le lavage ; le broyage ; le malaxage	9
I.3.1.2.L'extraction	10
I.3.1.3. La décantation par centrifugation	10
I .3.1.4.Le stockage	10
<b>I.4. Composition générale des huiles d'olive</b>	12
I.4.1 Les acide gras	12
I.4.2 Les composés phénoliques	13
I.4.3. Les tocophérols	15
I.4.4 Les composés aromatiques	16
<b>I. 5. Définition et critères de qualité</b>	17
<b>I.6. Facteurs déterminant la qualité de l'huile d'olive</b>	20
<b>I.7.Biochimie de la vitamine E</b>	23
I.7. 1. Tocophérols (Vitamine E)	23
I.7.2. Définition	23
I.7. 3. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E	25
I.7.4. Source de la vitamine E	25
I.7.5. Biosynthèse de la vitamine E	27
I.7.6. Rôle biologique de la vitamine E	27
<b>I.8.Propriétés spectroscopiques d'absorption UV- visible de la vitamine</b>	28
I. 8.1. Excitation électronique et groupements fonctionnels	29
I.8.2.Types de transitions	30
I.2.3. Mesure expérimentale de l'absorbance	32
I.8.4 Limite de la loi de Beer Lambert	33

<b>CHAPITRE II : Méthodes de dosage de la vitamine E</b>	34
<b>II.1. Problématique</b>	35
<b>II.2. Traitement de l'échantillon</b>	35
II.2.1. Les procédés d'obtention	35
II.2.2. L'extraction liquide-liquide (ELL)	36
<b>II.3. Méthodes de séparation</b>	36
II.3.1. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	37
<b>II. 4. Techniques de détection</b>	39
<b>II.5. Dosage de la vitamine E par HPLC en phase inverse</b>	40
II.5.1. Principe de la méthode	40
II.5.2. Description du système RP-HPLC utilisé	41
II.5.3. Mise en marche du système HPLC	47
<b>II.6. Analyse quantitative par Chromatographie Liquide Haute Performance RP-HPLC</b>	48
II.6.1. Principe	48
II.6.2. L'étalonnage externe	49
II.6.3. L'étalonnage interne	50
II.6.4. Détermination du degré de pureté de l' $\alpha$ -tocophérol	51
II.6.5. Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'échantillon d'huile d'olive	54
II.6.6. Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'échantillon d'huile d'olive dopé avec l'étalon pur	56
<b>II.6.7. Préparation de la droite d'étalonnage externe</b>	57
II.6.7.1. Matériels et réactifs	57
II.6.7.2. Préparation des solutions Primaires	57
II.6.7.3. Préparation des solutions secondaires	57
II.6.7.4. Préparation des solutions étalons	58
<b>II.6.8. Résultats</b>	59
<b>II.6.9. Discussion</b>	61
<b>II.7. Linéarité</b>	62
<b>CHAPITRE III : Dosages des échantillons d'huile d'olive par RP-HPLC</b>	64
<b>III.1. Dosage des échantillons d'huile d'olive</b>	65
III.1.1. Nature des échantillons	65
III.1.2. Traitement des échantillons	67

III.1.3. Résultats	69
<b>III.1.4. Discussion</b>	72
III.1.4.1. Distribution des aires des pics de l' $\alpha$ -tocophérol de la troisième série	72
III.1.4.2. Evaluation des teneurs en vitamine E des échantillons analysés	73
<b>Conclusion</b>	75
<b>Références bibliographiques</b>	78

# **Introduction générale**

## **Introduction général**

L'huile d'olive est une des principales composantes du régime dit « méditerranéen », connu pour son action bénéfique sur la santé. Elle est caractérisée par sa composition particulière en acides gras, en composés mineurs appartenant à la fraction insaponifiable des huiles végétales. Ses caractéristiques physicochimiques et organoleptiques sont définies par la norme commerciale du Conseil Oléicole International (COI, 2009) et au niveau européen, par l'annexe I du règlement (CEE) n° 2568/91 (CEE, 1991).

Elle contient une forte teneur en acide gras mono-insaturés représentée par l'acide oléique de la famille oméga-9 (65 à 80 %), 15 % d'acides gras saturés et 10 % d'acides gras polyinsaturés représentés par l'acide linoléique oméga-6 dominant et des traces de l'acide  $\alpha$ -linoléique oméga-3, acides gras essentiels, indispensables car non synthétisables par l'organisme humain. Les composés mineurs sont représentés par les phénols, tocophérols, caroténoïdes et les stérols. Plusieurs paramètres influencent la composition d'huile comme par exemple, la variété et le degré de maturité des fruits. Les méthodes d'extraction et de conservation de l'huile et enfin les conditions climatiques et agronomiques.

Parmi les principaux composés mineurs c'est la vitamine E, qui fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs. Elle existe sous huit formes, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. La forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Elle est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques. A cet égard, elle participe avec nombreuses autres substances, à la lutte contre les formes réactives de l'oxygène, c'est-à-dire la lutte contre les radicaux libres et les éléments non radicalaires produits lors de la formation des radicaux libres.

L'absence de données sur les caractéristiques des huiles d'olive algériennes nous a conduits à Entreprendre ce travail. Celui-ci a pour objectif de caractériser ces huiles d'olive par leurs teneur en  $\alpha$ -tocophérol en fonction du lieu géographique, de la nature du sol, de la région de culture et des cultivateurs.



Le développement de la chromatographie liquide à haute performance au cours de ces dernières années a en effet permis d'ouvrir de nouveaux horizons pour la conception de méthodes très spécifiques pour le dosage de cette vitamine.

L'objectif de ce mémoire est de réaliser le projet d'étude pour caractériser ces huiles d'olive par leurs teneurs en  $\alpha$ -tocophérol. Le thème de cette étude est « **Détermination des antioxydants des huiles d'olives (N.W Algérie)** ». Ce projet est réalisé au laboratoire de recherche en Spectrochimie et Pharmacologie structurale de l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen de la faculté des sciences.

Le dosage de l' $\alpha$ -tocophérol se fait par chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversée RP-HPLC, qui est considérée comme la méthode analytique la plus utilisée et la plus fiable pour la mesure régulière de la concentration de cet élément dans l'huile d'olive. La quantification de cet élément est réalisée par étalonnage externe dans le but de minimiser et compenser les erreurs commises le long des étapes de l'analyse. La méthode chromatographique appliquée est caractérisée par l'injection directe de surnageant obtenu après traitement de l'échantillon.

Le présent manuscrit est réparti en trois chapitres :

- ✚ En premier chapitre, nous traitons la composition générale d'huile d'olive et leurs techniques d'extraction, la biochimie et les propriétés de la vitamine E.
- ✚ Le deuxième chapitre nous explique la méthode de dosage de la vitamine E par la chromatographie liquide à haute performance
- ✚ Pour le chapitre trois, on évoquera au dosage de la vitamine E dans des échantillons des wilaya d'Algérie en appliquant la méthode expliquée dans le deuxième chapitre.
- ✚ Finalement nous terminons avec une conclusion et des perspectives de notre recherche.

# **Chapitre I**

## **Bibliographie**

## **I.1. Olivier et huile d'olive**

### **I.1. Généralité**

L'étude de l'huile d'olive mérite une attention particulière, compte tenu de la place spécifique qu'elle occupe parmi les huiles de table, et ce pour plusieurs raisons:

- l'huile d'olive est la plus ancienne huile connue, sa consommation remonte à l'antiquité,

- sa zone de production correspond à celle de la civilisation gréco-romaine et à travers elle, la notre, c'est par celle-là que la culture de l'olivier, la production et la consommation de l'huile d'olive se sont répandues dans tout le bassin méditerranéen,

- l'huile qui est le jus d'un fruit est presque uniquement consommée à l'état vierge. Elle est pratiquement la seule aujourd'hui à avoir cette particularité.

Toutes les études démontrent que les régimes alimentaires à base d'huile d'olive sont bénéfiques pour la santé humaine en diminuant le risque de plusieurs maladies.

De nombreuses recherches ont été faites pour en garantir sa pureté, son authenticité et sa qualité. Elle est également une de celles pour lesquelles on a observé en premier l'influence de la variété, la région de culture et les conditions climatiques sur la composition et les caractéristiques [1].

### **I.2. Production d'huile d'olive**

#### **I.2.1. De l'olivier à l'huile d'olive**

Si la production de l'huile d'olive est actuellement en plein essor, celle-ci n'est pas un produit du XXI<sup>e</sup> siècle. En effet des fossiles de fragments d'olivier datant du XII<sup>e</sup> millénaire avant Jésus Christ ont été retrouvés autour de la Méditerranée [2]. L'olivier et l'huile d'olive font partie intégrante de l'histoire du bassin méditerranéen et on les retrouve au fil des siècles à travers différents mythes et croyances. C'est notamment le cas dans la mythologie grecque où Athéna devint protectrice d'Athènes au dépens de Poséidon après avoir offert à la ville d'Athènes un présent bien plus utile que le cheval de Poséidon : un olivier. Le bois d'olivier servira ensuite pour les gravures de divinités grecques. Les premiers vainqueurs des jeux olympiques se voyaient remettre des rameaux d'olivier et des jarres d'huile d'olive en récompense de leurs performances. De tout temps l'olivier a été associé à des vertus telles que la sagesse, la paix, la victoire, la richesse et la fidélité.

Il y a aujourd'hui près d'un milliard d'oliviers (*Olea europaea L.*) cultivés à travers le monde et cela sur presque tous les continents. Plus de 90% des oliviers sont cultivés dans le bassin méditerranéen, notamment en Espagne, en Italie et en Grèce. Il existe plus de cent

variétés d'oliviers, cultivées en fonction de leur objectif final. Les olives peuvent avoir deux grandes utilisations : la première est l'utilisation en tant que fruit entier ou encore appelée "olives de table", la seconde est pour la production d'huile d'olive. La production mondiale d'olives de table est d'environ un million de tonnes soit 10 % de la récolte totale d'olives. La grande majorité des olives est donc utilisée pour la fabrication de l'huile d'olive.

Après une forte augmentation au cours des années 1990, la production mondiale d'huile d'olive reste relativement stable depuis le début des années 2000 avec une production annuelle située entre 2,4 et 3,2 millions de tonnes [3]. Les variations observées d'une année à une autre sont dues à la fois aux conditions climatiques et au fait que les olives ne grandissent que sur des bois de 2 ans (récolte bisannuelle). La production mondiale est grandement influencée par celles de l'Espagne et de l'Italie qui représentent à eux seuls près des 2/3 de la production mondiale (Tableau 1).

**Tableau 1** : Répartition de la production mondiale d'huile d'olive (campagne 2009/2010) [3]

Pays	Production (1000tonnes)	Production (%Total Monde)
Espagne	1200	41,6
Italie	540	18,7
Grèce	348	12,1
Portugal	50	1,7
France	5	0,2
<b>Total Europe</b>	<b>2148 ,4</b>	<b>74,6</b>
Syrie	150	5,2
Turquie	147	5,1
Tunisie	140	4,9
Maroc	95	3,3
Algérie	50	1,7
<b>Total Monde</b>	<b>2881,5</b>	

**Tableau 2** : Répartition de la consommation mondiale d'huile d'olive (campagn2009/2010) [4].

Pays	Production (1000tonnes)	Production (% Total Monde)
Italie	710	25,0
Espagne	560	19,7
Grèce	220	7,7
France	108,8	3,8
Portugal	74	2,6
Royaume-Uni	<b>55,5</b>	<b>2,0</b>
Allemagne	51,4	1,8
<b>Total Europ</b>	1856,5	65,4
Etats-Unis	260	9,2
Syrie	120	4,2
Turquie	98	3,5
Maroc	<b>70</b>	<b>2,5</b>
Algérie	<b>50</b>	<b>1,8</b>
Brésil	<b>42,5</b>	<b>1,5</b>
Tunisie	<b>35</b>	<b>1,2</b>
Japon	<b>29,5</b>	<b>1,0</b>
<b>Total Monde</b>	<b>2839</b>	

Parmi les principaux pays producteurs européens, seule l'Espagne a très significativement augmenté sa production d'huile d'olive depuis la campagne 1999/2000, le reste des pays européens a eu une production stable voire légèrement décroissante (Italie, Grèce). La production française a été multipliée par 4 entre 1990 et 2000 et se situe autour des 4 000 tonnes depuis le début des années 2000 soit seulement 0,2% de la production européenne. Les principaux pays producteurs sont également les principaux consommateurs de cette huile. Le tableau 2 donne la consommation globale des principaux pays consommateurs d'huile d'olive.

L'Italie et l'Espagne apparaissent une nouvelle fois en première ligne de ce classement, cependant ce tableau ne tient pas compte de la population des différents pays.

En effet, si l'on calcule la consommation par habitant, la Grèce arrive en tête avec environ 20 L d'huile par an et par habitant, loin devant les 12 L annuels des Espagnols et des

Italiens. Les tableaux 1 et 2 montrent que l'huile d'olive est principalement un produit méditerranéen, tant pour ce qui est de sa production que pour sa consommation. Cette production millénaire joue un rôle important dans l'économie de ce bassin et elle fait également partie de sa culture et de son régime alimentaire [5-6]. Cependant, à l'échelle mondiale, les 3 millions de tonnes d'huile d'olive ne représentent qu'environ 2,5% des huiles de tables [7]. , loin derrière l'huile de soja, l'huile de palme, l'huile de colza et l'huile de tournesol [8].

### I.3. L'huile d'olive

Parmi les huiles végétales alimentaires, l'huile d'olive occupe un rang privilégié notamment par le fait que cette huile, soit consommée surtout à l'état vierge. Le Conseil Oléicole International [9] a classé l'huile d'olive en quatre catégories selon un ensemble de paramètres reportés dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Paramètres analytiques Standards de qualité de l'huile d'olive [9]

Paramètres	Huile d'olive			
	Extra vierge	vierge	Vierge ordinaire	Vierge lampante
Acidité libre (% d'acide oléique)	$\leq 1,0$	$\leq 2,0$	$\leq 3,3$	$> 3,3$
Indice de peroxide (meq O <sub>2</sub> /kg)	$\leq 20$	$\leq 20$	$\leq 20$	aucune limite
Absorbance K270 dans l'UV	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,30$	aucune limite
$\Delta K$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	aucune limite
Evaluation Organoléptique	$\geq 6,5$	$\geq 5,5$	$\geq 3,5$	$\leq 3,5$

$\Delta K$ : variation de l'extinction spécifique aux environs de 270 nm

### **I.3.1. Techniques de transformation de l'olive**

Le procédé de fabrication de l'huile d'olive est relativement simple mais nécessite de respecter avec soin ses différentes étapes: lavage, broyage, pressurage, décantation et stockage.

#### **I. 3.1.1. le lavage, le broyage, le malaxage**

Au plus tôt après la cueillette, les olives destinées à la fabrication de l'huile sont triées pour éliminer les brindilles et les feuilles, puis lavées à l'eau froide. Ensuite, les olives sont broyées immédiatement, pour éviter toute oxydation, avec les noyaux, qui contiennent un antioxydant, comme conservateur naturel. Le broyage peut être effectué avec des meules en pierre ou avec un broyeur métallique. Le broyage ne suffit pas à briser la totalité des vacuoles contenant l'huile. Pour libérer le maximum d'huile, un malaxage est appliqué à la pâte jusqu'à l'obtention d'une pâte onctueuse pour faciliter l'extraction.

Le broyage et le malaxage permettent d'obtenir une pâte qui contient de la matière solide ( débris des noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires,...) et du fluide (huile et l'eau de végétation, c'est-à-dire l'eau contenue dans les cellules de l'olive).

### **I.3.1.2. L'extraction**

On peut exprimer l'huile soit par décantation soit par pression. La décantation se fait dans un décanteur, cylindre métallique tournant à grande vitesse (4000 tours/minute), dans lequel les différents composants de la pâte se séparent en fonction de leur densité. L'huile, plus légère que l'eau et les matières solides, se recueille séparément des autres éléments au centre du cylindre. La pression est le procédé le plus ancien. La pâte est répartie sur des disques en fibre naturelle ou synthétique tressés appelés scourtins, qui servent à la fois d'armature et de filtre lors de la pression. Une centaine de ces disques sont empilés pour être pressés. La partie liquide, constituée d'eau de végétation (margines), et d'huile, s'écoule, alors que la partie solide (noyaux et pulpe) reste entre les scourtins : c'est ce que l'on appelle le grignon. C'est durant ce processus que l'oleuropéine au goût amer est éliminée dans les eaux de végétation.

### **I.3.1.3. La décantation par centrifugation**

Le liquide obtenu à l'extraction est composé d'huile et d'eau. Il est entraîné dans un décanteur centrifuge qui va séparer l'huile, les déchets solides résiduels et la margine. Jadis, la décantation se faisait par un procédé naturel: l'huile, plus légère que l'eau, remontait à la surface des margines et était recueillie.

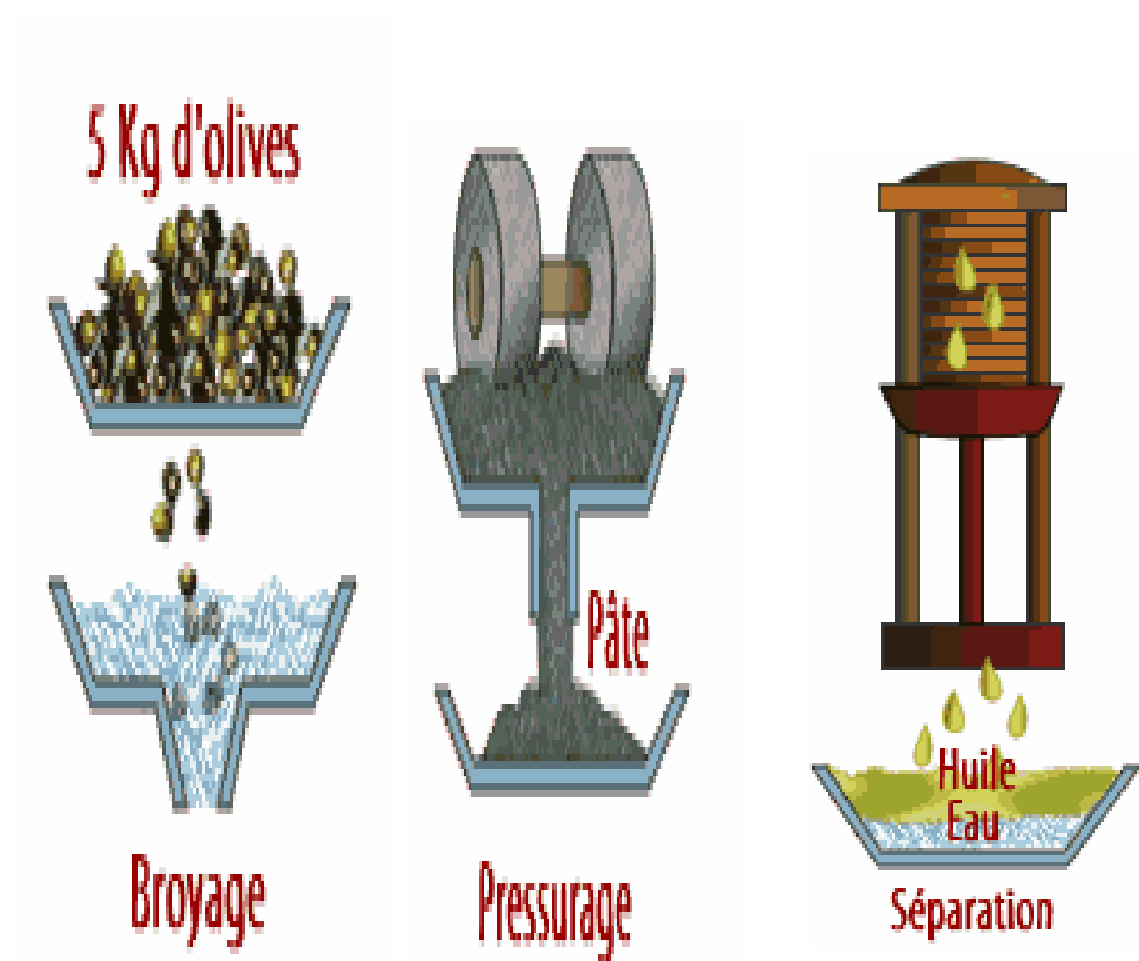
### **I .3.1.4. Le stockage**

L'huile d'olive est immédiatement stockée dans des cuves en inox afin d'éviter l'oxydation. L'huile peut alors être filtrée pour la rendre limpide et brillante ou bien être mise en bouteille en l'état. Une fois embouteillée, l'huile d'olive doit être conservée à l'abri de la chaleur et de la lumière.

Il existe deux méthodes d'extraction de l'huile d'olive: la méthode traditionnelle artisanal et la méthode moderne.



La méthode traditionnelle artisanale est la plus ancienne est la plus répandue, elle utilise la meule en pierre pour le broyage des olives, le pressoir manuel pour les moulins les plus anciens ou le pressoir hydraulique. La décantation et la séparation de l'huile s'effectuent en bassin. Le ramassage de l'huile s'effectue après filtration manuelle [10].



**Figure 1 :** Procédés général d'extraction des l'huiles d'olives

## I.4. Composition générale des huiles d'olive

Les huiles d'olive vierges jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire et sont importantes en nutrition humaine pour plusieurs raisons. En premier lieu, car les lipides sont la principale source d'énergie pour le corps humain en comparaison de leur masse.

De plus, l'intérêt pour les huiles d'olive a été accru depuis la découverte de leur richesse en vitamines liposolubles et en polyphénols qui sont des antioxydants. Elles sont également une source importante d'acides gras poly-insaturés essentiels car non synthétisables par le corps humain. Si les acides gras sont les constituants majeurs de l'huile d'olive, ce sont les constituants mineurs qui permettent l'authentification d'une huile, tant sur le plan de la provenance géographique que sur sa qualité physico-chimique.

### I.4.1. Les acides gras

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides. Ces lipides contiennent une fraction principale dite saponifiable (phospholipides, triglycérides) et une fraction mineure insaponifiable (stérols, vitamines liposolubles, caroténoïdes).

Les lipides sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques.

Les acides gras sont des molécules organiques comprenant une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxyle. Cette chaîne carbonée peut être dépourvue de toute double liaison carbone-carbone, dans ce cas, les acides gras sont dits « saturés ». Elle peut également contenir une double liaison (acides gras mono-insaturés AGMI) ou plusieurs doubles liaisons (acides gras poly-insaturés AGPI).

Pour les acides gras insaturés, ils sont souvent référencés selon la position de la première double liaison par rapport au groupement méthyle terminal. Il existe deux grandes familles d'AGPI: La série en n-6 (ou oméga 6) et la série en n-3 (ou oméga 3).

Dans l'huile d'olive on trouve de l'acide linoléique (oméga 6) et de l'acide alphalinoléique (oméga 3). Ces acides gras sont dits « essentiels » car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'homme et doivent donc être apportés par l'alimentation. Dans la nature, les acides gras sont, généralement, sous forme de tri-esters entre des acides gras et du glycérol selon la formule:



La variabilité en acides gras est relativement importante, mais en moyenne, l'huile d'olive vierge se compose de 72% d'acides gras mono-insaturés (AGMI), 14% d'acides gras polyinsaturés (AGPI) et de 14% d'acides gras saturés (AGS) [11] L'acide gras majoritaire est l'acide oléique qui représente à lui seul près de 70% des acides gras.

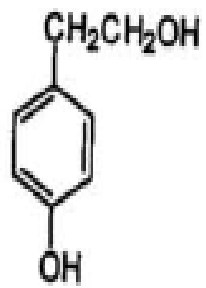
Les acides gras poly-insaturés représentent une fraction non négligeable de l'huile et sont majoritairement composés d'acide linoléique.

#### **I.4.2. Les composés phénoliques**

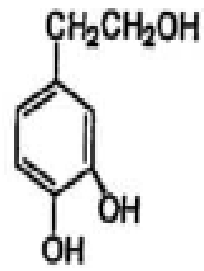
Si les acides gras représentent la très grande majorité de la composition de l'huile d'olive en termes de masse, les composés mineurs tels que les composés phénoliques jouent un rôle très important dans la caractérisation des huiles et pour leur intérêt nutritionnel.

L'huile d'olive contient des composés phénoliques simples et complexes qui augmentent sa stabilité et lui confèrent des propriétés antioxydantes et modulent sa saveur [12-13]. Les composés phénoliques contribuent fortement au goût piquant, à l'astringence et à l'amertume des huiles [14].

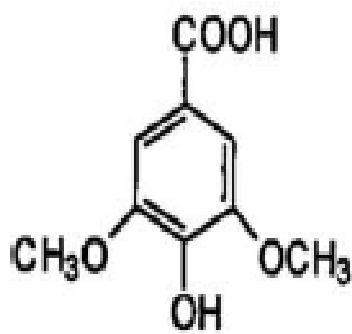
Les composés phénoliques trouvés dans l'huile d'olive vierge sont: l'Oléuropéin (un hétérosidique ester d'acide élenoléique avec 3,4 dihydroxyphenethylalcohol (hydroxytyrosol)); le dimethyloléuropéin (acide dérivé de l'oléuropéin); le ligstroside (un hétérosidique ester d'acide élenoléique avec 4 hydroxyphenethylalcohol (tyrosol)); l'acide caféique [15-16]. La majorité des composés phénoliques existant dans l'huile d'olive vierge est constituée de tyrosol et d'hydroxytyrosol [17]. La Figure 2 présente les structures chimiques de quelques composés phénoliques.



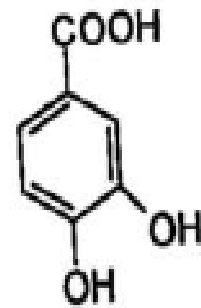
tyrosol



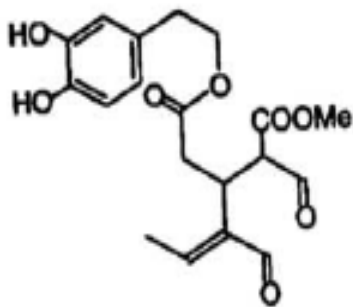
hydroxytyrosol



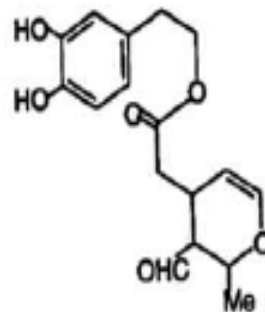
syringic acid



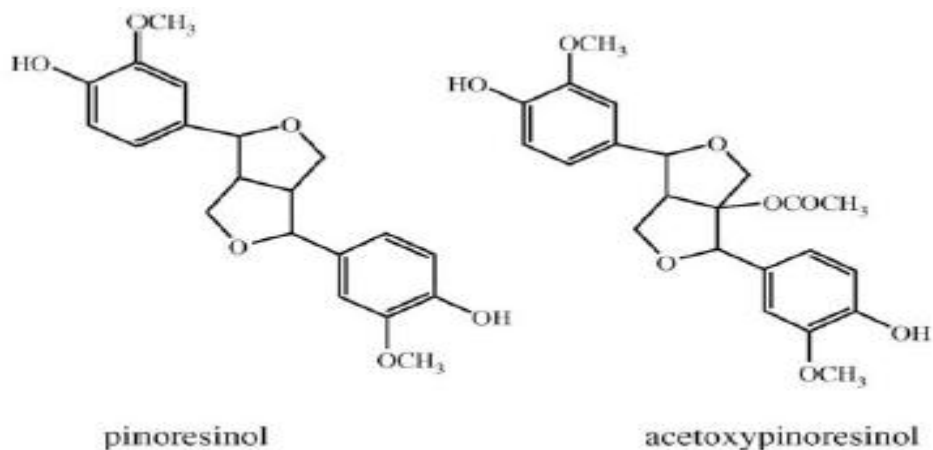
protocatechuic acid



dialdehydic form of  
oleuropein aglycone



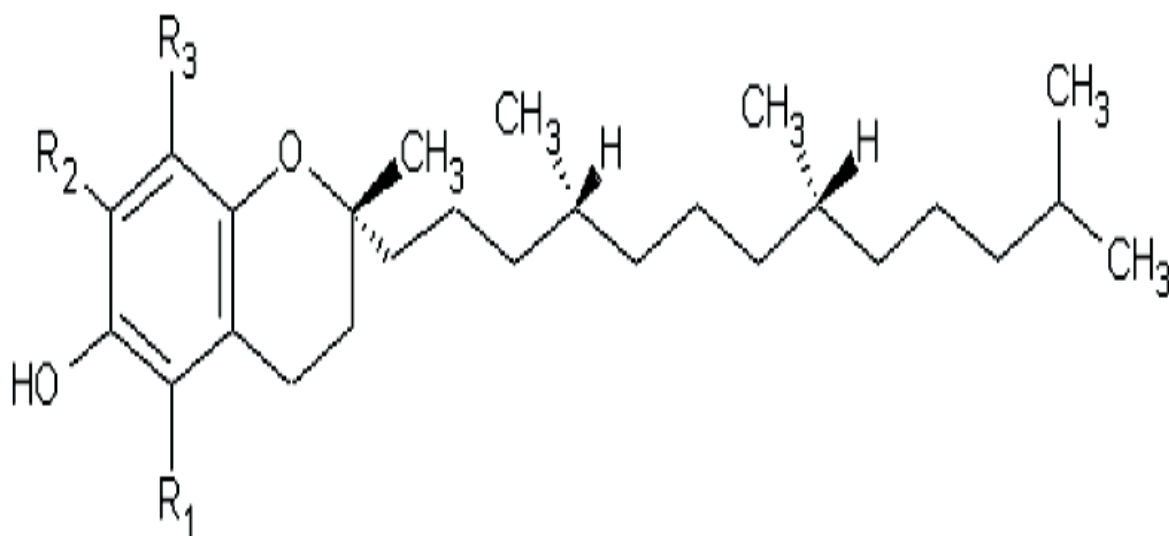
decarboxymethyl form of  
oleuropein aglycone



*Figure 2 : Structures chimiques des quelques composés phénoliques [18]*

### I.4.3. Les tocophérols

La vitamine E ou tocophérol (Figure 3) est une vitamine liposoluble. Elle est reconnue comme étant essentiellement un antioxydant. Les tocophérols sont constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone. L'alpha-tocophérol représente à lui seul 90% de totalité des tocophérols [19]. Cependant, on trouve également un peu de beta- et gamma-tocophérols, alors que le delta-tocophérol n'est présent qu'à l'état de traces [20].



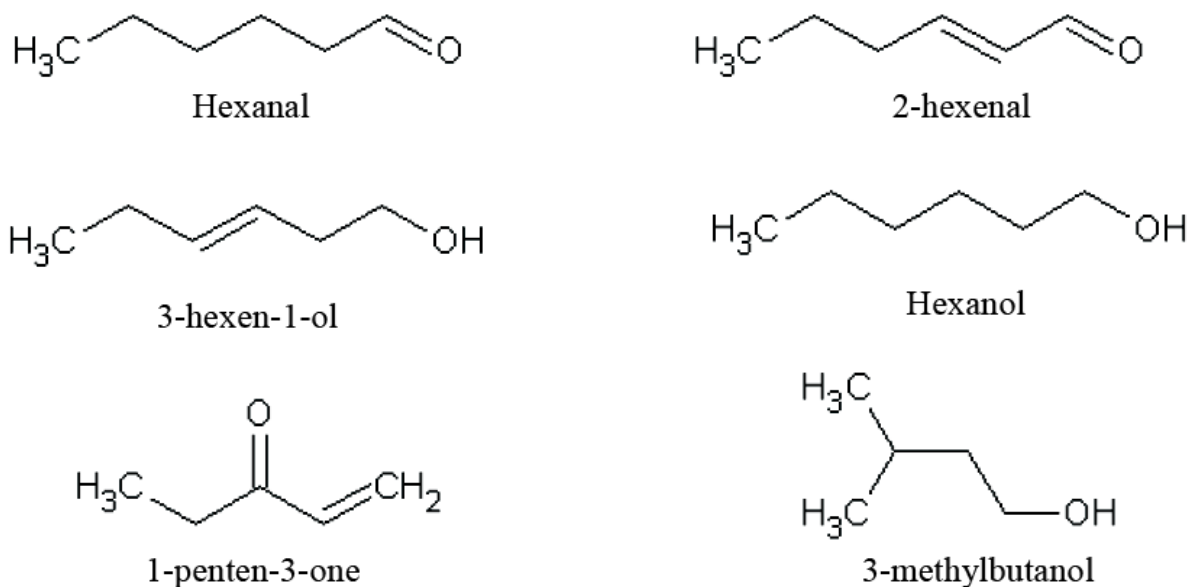
Formule brute	Masse molaire	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
$\alpha$ : C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430,7	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ : C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	416,7	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ : C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	416,7	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$ : C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	402,6	H	H	CH <sub>3</sub>

**Figure 3** : Structure des tocophérols

L'alpha-tocophérol est en effet connu pour être l'antioxydant lipophile le plus puissant pour limiter le processus d'oxydation radicalaire. Il est aussi l'antioxydant le plus important dans les LDL et pourrait donc jouer un rôle clé en inhibant leur oxydation. Une fois oxydé, l'alpha-tocophérol peut être régénéré par l'acide ascorbique (vitamine C) ou l'ubiquinol [21]. En plus de leur activité antioxydante, les tocophérols ont été associés à un ralentissement de la propagation cellulaire, de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des monocytes dans les vaisseaux sanguins.

#### **I.4.4. Les composés aromatiques**

Les composés aromatiques sont des molécules de faible poids moléculaire possédant une volatilité à température ambiante. Ce sont les hydrocarbures, les alcools, les aldéhydes, les esters, les phénols et les dérivés phénoliques, les terpènes oxygénés, et les dérivés du furfuranne. Ils ne sont pas tous odorants: l'hexane, l'octane et quelques dérivés du furfuranne sont inodores, d'autres, à la concentration trouvée dans l'huile d'olive, n'apportent qu'une contribution minime à la saveur.



**Figure 4 :** Structure chimique des composés volatiles majoritaires

## I. 5. Définition et critères de qualité

Il y a plusieurs manières de définir la qualité et peut-être il n'y a aucune définition universelle applicable à toutes les situations. D'une façon générale, la qualité est définie comme étant « la combinaison des attributs ou des caractéristiques d'un produit qui ont une signification en déterminant le degré d'acceptabilité de ce produit par l'utilisateur [22].

Le Conseil Oleicol International [23] et le règlement de la Commission Européenne [24] ont défini la qualité d'huile d'olive, basée sur les paramètres qui incluent le pourcentage d'acide gras libre, la teneur en indice de peroxyde, le coefficient de l'extinction spécifique  $K_{232}$  et  $K_{270}$ , ainsi que les caractéristiques sensoriels.

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont proposé d'inclure les phénols comme un bon indicateur de qualité d'huile d'olive [25 - 26 ].

Les normes du Codex Alimentarius [27] ont établi des critères complémentaires de qualité des différentes catégories d'huile d'olive. Elles incluent des limites suggérées pour les substances volatiles, les impuretés insolubles, les insaponifiables, les oligo-métaux, la densité et l'indice de réfraction. Quant au règlement de la CE, il est plus spécifique au sujet de l'évaluation sensorielle.

**Tableau 4:** Caractéristiques de la qualité de l'huile d'olive [7]

Types	Acidité %	Indice de peroxyde	K232	K270	Solvants halogens
Huile d'olive extra	max	max 20	max	max	max 0.2
Huile d'olive vierge	max	max 20	max	max	max 0.2
Huile d'olive vierge	max	max 20	max	max	max 0.2
Huile d'olive vierge	> 3.3	>	max	> 0.25	> 0.2
Huile d'olive raffinée	max	max 10	max	max	max 0.2
Huile d'olive	max	max 15	max	max	max 0.2
Huile de grignon	min	--	--	--	
Huile de grignon	max	max 10	max	max	max 0.2
Huile de grignon d'olive	max 1.5	max 15	max 5.30	max 2.00	max 0.2



**Tableau 5 : Critères de qualité des différents types d'huiles d'olive [7]**

Types	Acidité %	Matières volatiles à 105° max	Impuretés insolubles max	Indice de peroxyde méquiv.O2/Kg max	Couleur	Odeur	Goût	Fer (Fe) Ppm	Cuivre (Cu) Ppm	K270
Extra	1.0	0.2%	0.1%	20				5	0.4	≤0.25
Vierge	1.5	0.2%	0.1%	20				5	0.4	≤0.25
Vierge semi-lampante	3.3	0.2%	0.1%	20				5	0.4	≤0.30
Lampante	>3.3	0.3%	0.2%	Non spécifié				5	0.4	
Raffinée	0.3	0.1%	0.05%	10	jaune clair	Acceptable	Acceptable	5	0.4	≤1.10
Huile d'olive	1.5	0.1%	0.05%	20	du jaune clair au	Bonne	Bon	5	0.4	≤0.90
Huile de grignon d'olive brute	--	1.5%	Non spécifié	Non spécifié						
Huile de grignon d'olive raffinée	0.3	0.1%	0.05%	10	du jaune au marron	Acceptable	Acceptable	5	0.4	≤2.00
Huile de grignon d'olive	1.5	0.1%	0.05%	20	du jaune clair au vert	Acceptable	Acceptable	5	0.4	≤1.70

L'indice global de qualité est une approche simplifiée, adoptée par le Conseil Oléicole International [28], pour exprimer numériquement la qualité d'huile d'olive vierge. C'est une échelle entre zéro et dix qui prend en considération quatre paramètres de qualité, les points de l'évaluation sensorielle, l'acidité, K<sub>270</sub> et l'indice de peroxyde. Le tableau 6 présente les limites pour chaque paramètre de qualité et les coefficients de pondération.

**Tableau 6 :** Paramètres de qualité et coefficient de pondération pour l'estimation de l'indice global de qualité

	Limite	Coefficient de
Evaluation sensorielle	3.5 –	0.50
Acidité libre	0.1 –	0.25
K <sub>270</sub>	0.08 –	0.125
Indice de peroxyde	1.0 –	0.125

Les paramètres de qualité non inclus dans les normes internationales incluent: les antioxydants (tocophérols, phénols), les pigments, les diacylglycérols, les métaux [7].

## **1.6. Facteurs déterminant la qualité de l'huile d'olive**

Etant donné l'image très positive de l'huile d'olive, le Conseil Oléicole International vise à améliorer encore la qualité du produit qui dépend de plusieurs facteurs :

- en premier lieu, de la qualité des olives dont elle provient et en plus, des différentes étapes qui s'étendent de la production (labour, l'âge de l'arbre, taille des oliviers, quantité d'engrais, l'irrigation, la variété) à la cueillette des olives (l'état du fruit, son degré de maturation au moment de ramassage) et de la fabrication à la conservation de l'huile [29].

- le lavage des olives après la récolte : l'olive doit subir un lavage qui permet d'éliminer les levures et les microorganismes qui se trouvent sur la pellicule des drupes. Ces organismes unicellulaires peuvent passer dans l'huile et se développer, atténuant ainsi la qualité de l'huile [30]. Au bout de quelques mois de stockage l'huile devient de goût rance et dégage des odeurs désagréables. De même, l'opération d'effeuillage est nécessaire et recommandée pour améliorer la qualité des huiles produites.

- la rapidité de traitement des olives : une fois récoltées les olives doivent être pressées le plus rapidement possible sous peine de perdre leur parfum. Du fait de sa composition en huile, l'olive s'abîme très vite une fois récoltée. Cette dégradation sera d'autant plus accentuée que le stockage sera long (plus de 48 heures) et effectué dans de mauvaises conditions. Ceci provoque des échauffements des olives et déclenche le processus de fermentation, augmentant le taux d'acidité suivant un barème décrit dans le tableau ci- dessous [31].

**Tableau 7** : Corrélation entre la température, le taux d'acidité et le taux de peroxyde dans l'huile suivant la durée de conservation des olives et l'épaisseur des tas dans lesquels elles sont amassées selon Médawar, 2001b

Epaisseur des tas	0cm	20cm	40cm	Taux d'acidité (en %)	Taux de peroxyde (en ppm)
	Température (°C)				
Durée du stockage					
1 <sup>er</sup> jour	24	32	34	0,97	8,5
2 <sup>ème</sup> jour	25	40	42	1,22	8,8
3 <sup>ème</sup> jour	30	43	45	1,51	9,0
4 <sup>ème</sup> jour	30	46	48	1,54	9,2
5 <sup>ème</sup> jour	34	50	52	1,56	9,5
6 <sup>ème</sup> jour	33	44	47	2,38	9,7
7 <sup>ème</sup> jour	34	50	52	---	---
10 <sup>ème</sup> jour	33	50	53	2,83	10,1

- le traitement thermique de l'olive affecte d'autres traits de la qualité, comme la stabilité oxydative, la composition en arôme et également un changement du contenu de pigment de l'huile d'olive vierge [32].

- Les différents procédés d'extraction affectent la qualité de l'huile d'olive vierge et certains composants chimiques comme les polyphénols qui sont très solubles dans l'eau. En effet, l'huile d'olive vierge extraite à partir de la méthode dite de centrifugation contient moins de polyphénols; du fait que l'eau utilisée pour diluer la pâte, est tiède. Une augmentation dans la quantité de cette eau, dissout partiellement les polyphénols et réduit leur taux, et par conséquent la stabilité de l'huile d'olive au cours du stockage .

En revanche, l'huile obtenue par pression a les mêmes teneurs en ces composés, car elle ne nécessite pas l'ajout de l'eau.

Dans la plupart des huileries traditionnelles, le lavage des olives n'est pas pratiqué, alors que pour le système à 3 phases, il est appliqué après l'effeuillage.

- la température d'extraction : l'extraction se fait à froid, car à partir de 25° C, les arômes sont modifiés. Par ailleurs, Ouaini et ses collaborateurs [30], estiment qu'une température supérieure à 28° C au cours du broyage et du malaxage a un impact sur la qualité de l'huile. Ainsi un contact long entre la phase organique contenant l'huile et la phase aqueuse (marginé), au cours de la décantation dans les procédés traditionnels, conduit à des phénomènes d'oxydation.

Le tableau ci-dessous décrit les caractéristiques de qualité de l'huile d'olive vierge obtenue avec trois méthodes [33].

**Tableau 8** : Caractéristiques d'huile d'olive vierge extraites par différentes méthodes à partir d'olives de bonne qualité [33]

	Pression	Centrifugation	Percolation
Acidité (%)	0,23	0,22	0,23
Indice de Peroxyde (meq O <sub>2</sub> /kg)	4,0	4,9	4,6
Polyphénols totaux (mg/L acide gallique)	158	121	157
O-Diphénols (mg/L acide caféique)	100	61	99
Temps d'induction (heure)	11,7	8,9	11,2
Pigments chlorophylliens (ppm)	5,0	9,1	8,9
K232	1,93	2,01	2,03
K270	0,120	0,127	0,124
Evaluation Organoléptique	6,9	7,0	7,0

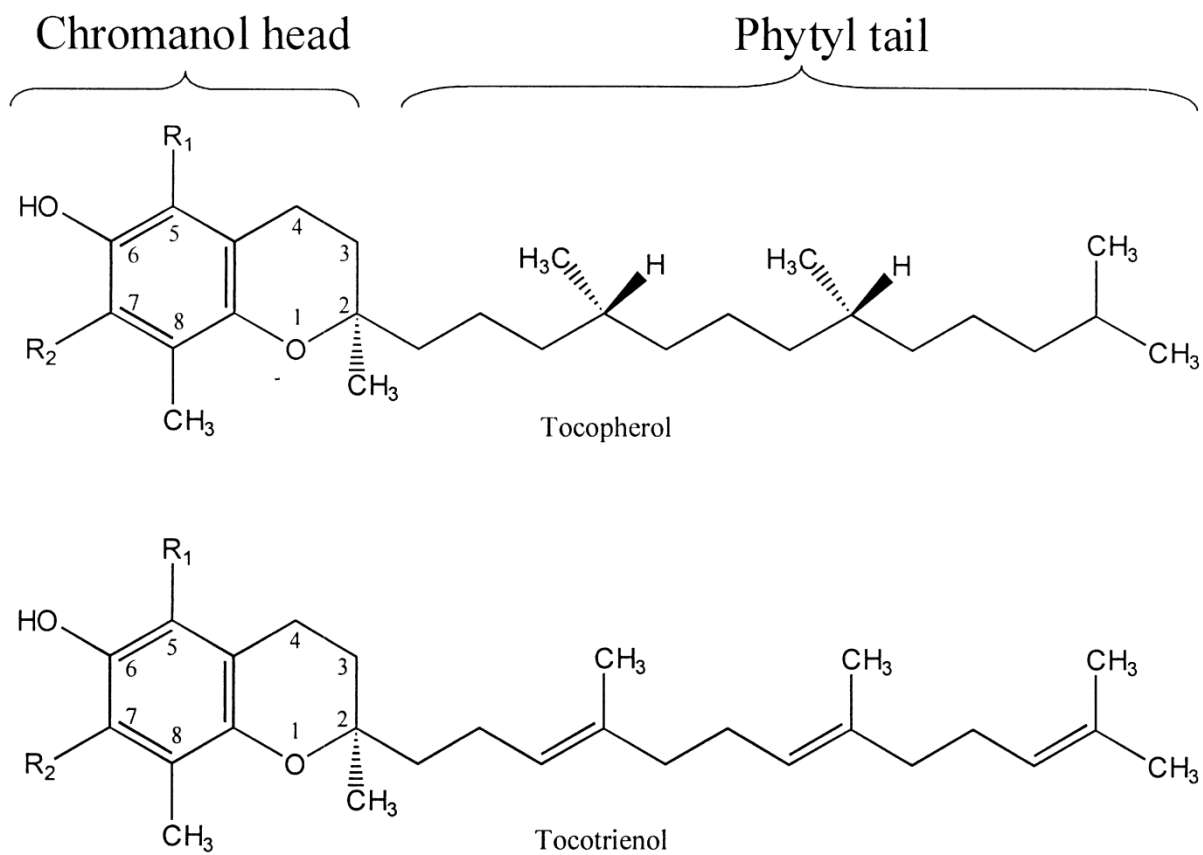
- le stockage et la conservation constituent des facteurs importants dans la qualité de l'huile destinée à la consommation. En effet, une fois l'huile obtenue, il est important de la stocker, à l'abri de la lumière et, dans un endroit frais et sec avec un minimum de contacts avec l'air, de préférence dans des récipients en acier inoxydable ou en verre et non en matière en plastique qui donne un mauvais goût à l'huile [ 34 ] . Des changements de température de conservation favorisent la dégradation de l'huile d'olive. Selon Kalua et al [35]. Les changements dans les paramètres de traitement devraient tenir compte des différences dans les cultures, la maturité, les pratiques agronomiques, les régions géographiques et l'impact sur la qualité globale d'huile d'olive.

## **I.7. Biochimie de la vitamine E**

### **I.7. 1. Tocophérols (Vitamine E)**

#### **I.7.2. Définition**

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs. Ce nom provient du grec tokos pour progéniture et Pherein pour porter, elle existe sous huit formes, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. Les tocophérols sont des substances constituées par un noyau commun hydroxychromane et une chaîne latérale saturée phytyle à 16 carbones. Le nombre et la position des groupements méthyle sur le noyau hydroxychromane définissent les différentes formes de tocophérols et tocotriénols. La forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Les  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérols ont une activité vitaminique réduite (respectivement 40 et 15 % environ de l'activité de la forme  $\alpha$ ), alors que la forme  $\alpha$ , est pratiquement inactive. Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale (Figure 5). Deux de ces produits possèdent également une certaine activité vitaminique: environ 20% pour l' $\alpha$ -tocotriénol et 5% pour le  $\beta$ -tocotriénol. Les autres sont inactifs.



$R_1$	$R_2$	Compound
$CH_3$	$CH_3$	$\alpha$
$CH_3$	H	$\beta$
H	$CH_3$	$\gamma$
H	H	$\delta$

**Fig 5** : Structure des tocophérols et tocotriénols .

### I.7. 3. Propriétés physico-chimiques de la vitamine E

A la température ambiante, les tocophérols se présentent sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques). Ils sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases. Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de dl- $\alpha$ -tocophérol sont relativement stables [36].

#### **I.7.4. Source de la vitamine E**

Les sources alimentaires (Tableau 9) les plus riches en vitamine E sont les céréales (seigle, Blé, avoine, etc.) [37] dont leurs germes, les fruits (bananes, fraise, melon, etc.), la plupart d'oléagineux, dont leurs huiles (tournesol, soja, maïs, olive, arachide, etc.). On trouve de la vitamine E dans les légumes (salade, épinard, chou, poireau), dans la graisse animale ainsi que dans le lait, le beurre et le fromage et également dans le poisson [38].

**Tableau 9:** Principales sources de vitamine E.

Sources naturelles de la vitamine E	Mg/ 100g
Huile de germe de blé	150 à 500
Huile de soja	150
Huile d'arachide	15 à 30
Amande, noisette	15 à 20
Germes de céréales	14 à 20
Huile d'olive	1 à 20
Haricot sec, petit pois	3 à 4
Cacao, farine de blé	3
Beurre, chou, lard	2 à 3
Oeuf, foie, maquereau	1 à 2
Lait maternel	0,7
Côte de porc	0,7
Filet de boeuf, laitue	0,6
Banane, carotte	0,5
Gruyère	0,3
Tomate, orange	0,2
Lait de vache	0,06

La vitamine E existe également sous forme synthétique: il s'agit du dl- $\alpha$ -tocophérol que l'on retrouve dans les suppléments en vitamine E. On retrouve également l'acétate ou le succinate de tocophérol. Bien que la forme synthétique soit bénéfique, la forme naturelle est particulièrement recommandée. En effet, elle est deux fois mieux assimilée par les tissus que sa forme synthétique. De plus, la forme naturelle est la plus active.



### **I.7.5. Biosynthèse de la vitamine E**

La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes, les algues et certaines plantes non photosynthétiques telles que les champignons. Il existe vraisemblablement deux voies de synthèse conduisant à la formation de la vitamine E, la voie des tocotriénols et la voie des tocophérols. Les sources alimentaires de vitamine E sont soit d'origine végétale, soit d'origine animale [39].

- Les produits d'origine végétale constituent la source majeure de la vitamine E, les éléments les plus riches étant les céréales (blé, orge, maïs), les huiles (huile de maïs, huile de palme, huile de noix de coco, huile de tournesol ...), les légumes et les fruits.

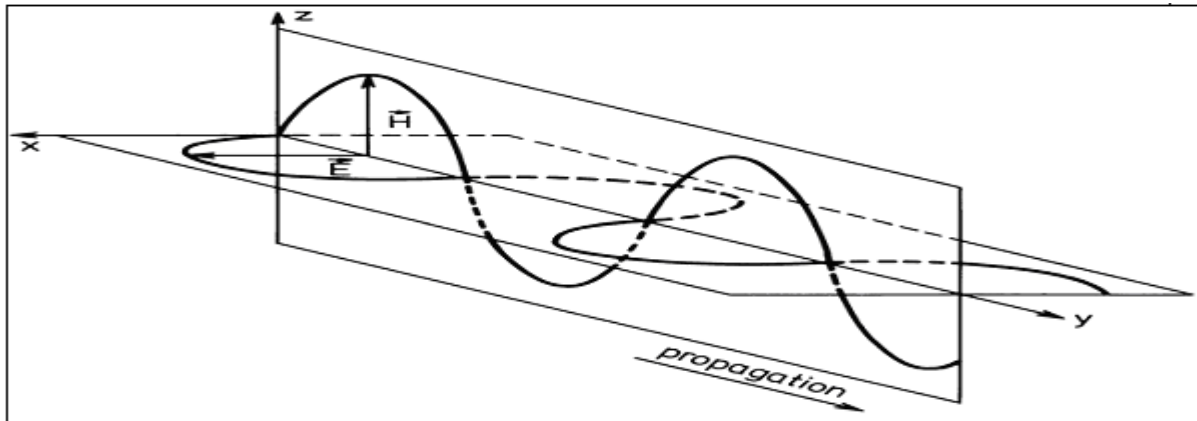
- Au niveau des produits d'origine animale, il faut signaler que la vitamine E est présente essentiellement sous forme d' $\alpha$ -tocophérol mais en quantité assez restreinte dans les tissus d'animaux (muscles et organes), dans le lait de vache et produits qui en dérivent.

### **I.7.6. Role biologique de la vitamine E**

La vitamine E est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques. A cet égard, elle participe avec nombreuses autres substances, à la lutte contre les formes réactives de l'oxygène, c'est-à-dire la lutte contre les radicaux libres et les éléments non radicalaires produits lors de la formation des radicaux libres [40]. Elle stabilise les membranes cellulaires parce qu'elle participe à la formation de phospholipides membranaires. La vitamine E a une action sur l'agégation plaquettaire. Les plaquettes sont riches en vitamine E et le déficit en ce dernier induit des microthromboses. En plus la vitamine E diminue l'activité de la lipoxigénase des plaquettes. Egalement, elle a une action sur le métabolisme des globules rouges. La vitamine E protège les membranes érythrocytaires contre l'action de la peroxydase de l'hémoglobine sur les AG désaturés. Elle exerce un effet régulateur sur la synthèse de l'hème et des enzymes hémiques comme le cytochrome et la catalase [41].

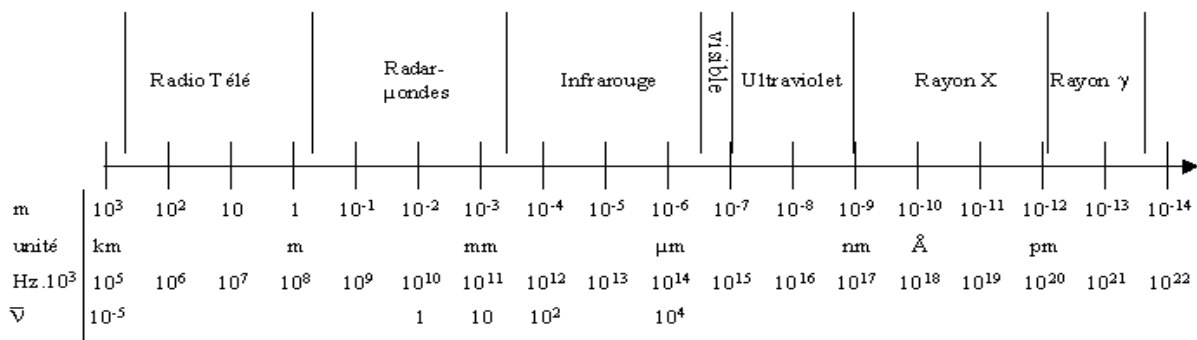
### I.8.1. Propriétés spectroscopiques d'absorption UV- visible de la vitamine E

La lumière est une onde électromagnétique composée de deux vecteurs oscillant : un champ électrique  $\vec{E}$  et un champ magnétique  $\vec{H}$ . Ces deux champs sont orientés perpendiculairement l'un à l'autre, et perpendiculairement à la direction de la propagation de l'onde comme le montre la figure suivante :



**Fig 6:** schéma d'une onde électromagnétique.

Le spectre complet des ondes électromagnétiques est continu, comme le montre le schéma ci-dessous. En examinant ce spectre, on constate que la région analytique de la lumière ultraviolette et visible ne représente qu'une infime partie de ce spectre. La région de l'ultraviolet se situe de 200 à 350 nm, tandis que celle du visible s'étend de 350 à 800 nm.



**Fig.7 :** Spectre du rayonnement électromagnétique.

L'énergie que possède une onde électromagnétique est reliée à sa fréquence de propagation par l'équation de Planck qui est la suivante :

$$E = h\nu$$

Où :

$h$  : Constante de Planck ( $h = 6,63 \times 10^{-34}$  j.s),

$\nu$  : Fréquence du rayonnement ( $s^{-1}$ ).

D'autre part, la fréquence d'une onde électromagnétique est reliée à sa longueur

d'onde par la relation suivante :

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

L'équation de Planck montre donc que l'énergie lumineuse est proportionnelle à la fréquence de l'onde et inversement proportionnelle à sa longueur d'onde :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

Où :

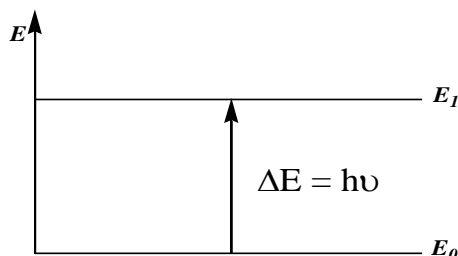
$c$  : Vitesse de la lumière dans le vide ( $C = 3.10^8 \text{ m.s}^{-1}$ ),

$\lambda$  : Longueur d'onde (m),

$\bar{\nu}$  : Nombre d'onde ( $\text{m}^{-1}$ ).

### I. 8.2. Excitation électronique et groupements fonctionnels

Lorsqu'un composé est exposé à des radiations lumineuses dans la région ultraviolette ou visible, il peut absorber une quantité spécifique d'énergie lumineuse. On dit que la molécule subit une excitation électronique, parce que certains électrons de la molécule sont projetés de leur orbitale normale (état fondamental)  $E_0$  à une orbitale de niveau supérieur (état excité)  $E_1$ .



**Fig8** : Transition entre deux niveaux énergétiques.

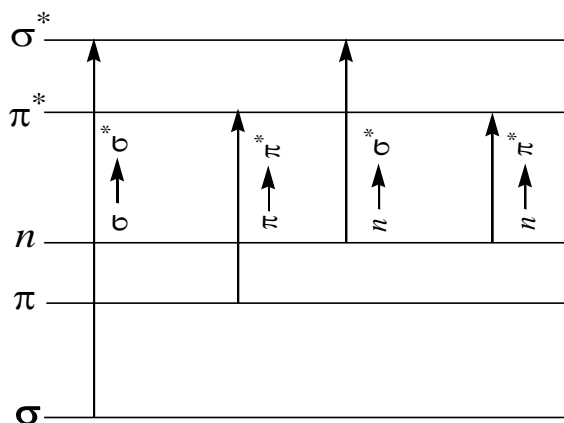
Pour un composé donné, l'énergie nécessaire à une excitation électronique doit correspondre à la différence d'énergie entre l'énergie de l'état fondamental et celle de l'état excité :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

L'équation de Planck montre qu'un composé spécifique ne peut être excité qu'à une fréquence ou à une longueur d'onde bien précise. La longueur d'onde d'absorption dépend fortement de la nature des orbitales mises en jeu  $\sigma$ ,  $n$  et  $\pi$ . Les électrons les plus facilement excitable dans un composé sont les électrons  $\pi$  des doubles liaisons et les électrons  $n$ , c'est-à-dire les doublets d'électrons libres sur la couche périphérique des hétéro atomes (N, O, S). Ces électrons sont portés par les groupements fonctionnels qu'on appelle chromophores.

### I.8.3. Types de transitions

A l'état fondamental les électrons occupent les orbitales liantes de haute énergie ( $\sigma$ ,  $\pi$  ou  $n$ ), après excitation électronique, l'électron peut promouvoir à occuper une orbital antiliante de plus basse énergie de l'état excité ( $\sigma^*$ ,  $\pi^*$ ) Les types de transitions permises sont comme suite :



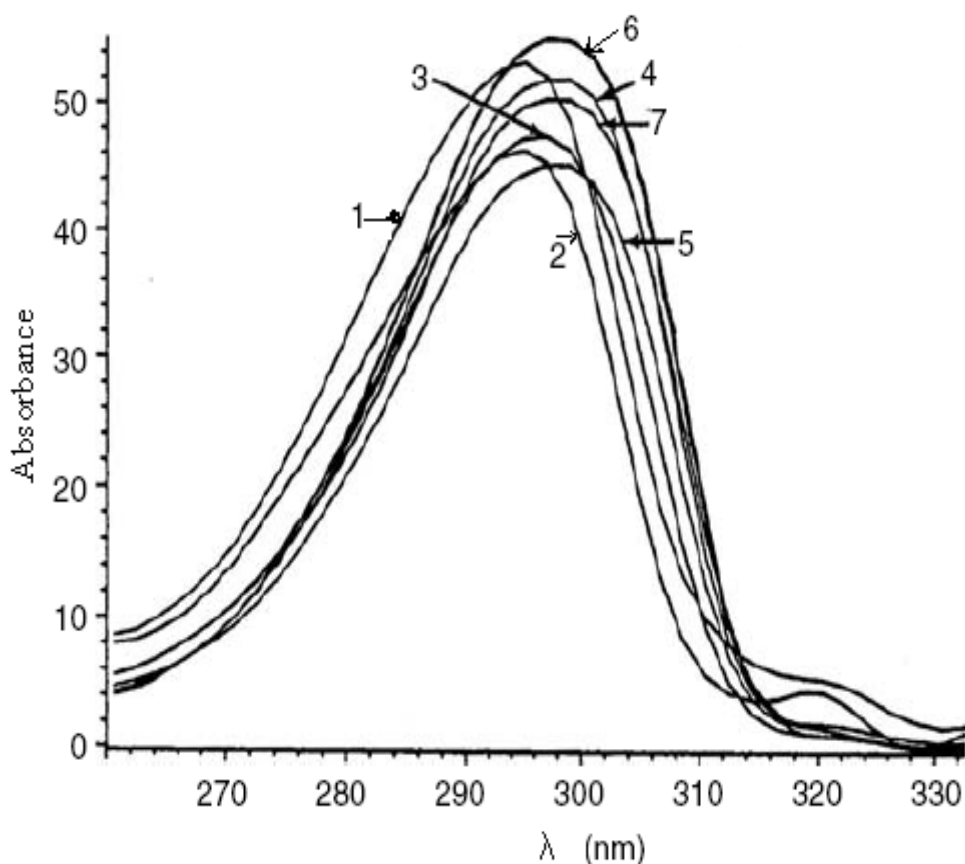
**Fig 9** : Types de transitions électroniques.

Les transitions  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  se situent dans l'ultraviolet lointain (vers 130 nm) et ne sont pas exploitées en chimie analytique, car les solvants commencent à absorber, mais également les molécules de l'air rendant la mesure plus que délicate, tandis que les transitions  $n \rightarrow \sigma^*$  se situent à l'extrême limite du proche ultraviolet.

La plupart des applications de spectroscopie d'absorption aux composés organiques sont basées sur les transitions  $n \rightarrow \pi^*$  et  $\pi \rightarrow \pi^*$ , parce que l'énergie qu'elles requièrent correspond à un domaine facilement accessible expérimentalement (200 à 700).

Les transitions  $n \rightarrow \pi^*$  qui sont rencontrés, dans le cas des molécules, comportent un hétéro atome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé comme pour le groupement carbonyle, dont la bande est observable entre 270 et 280 nm.

Les transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  concernent les composés, qui possèdent une double liaison éthylénique isolée, dont la position de la bande d'absorption peut être affectée par l'effet du solvant ou de la conjugaison. Dans le cas de la vitamine E, l'effet de conjugaison est très observé. Ainsi, pour la molécule d' $\alpha$ -tocophérol qui possède des doubles liaisons conjuguées, son maximum d'absorption se situe à 292 nm. Des spectres d'absorption UV caractéristiques des tocophérols et des tocotriénols sont montrés dans la figure suivante :

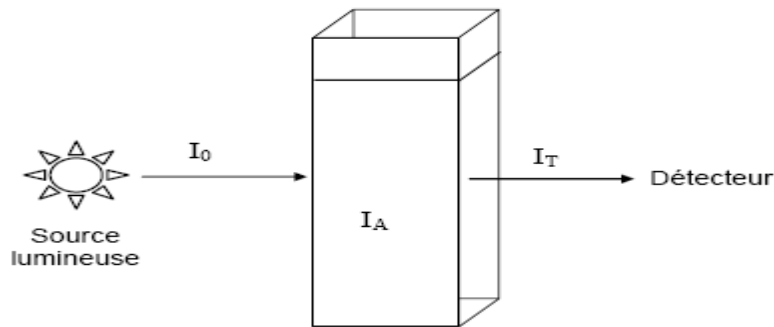


**Fig 10** : Spectre d'absorption UV caractéristique des tocophérols et des tocotriénols (1 =  $\alpha$ -T, 2 =  $\alpha$ -T3, 3 =  $\beta$ -T, 4 =  $\gamma$ -T, 5 =  $\gamma$ -T3, 6 =  $\delta$ -T, 7 =  $\delta$ -T3) [29].

## I.9. Mesure expérimentale de l'absorbance

L'utilisation de la spectroscopie dans les analyses quantitative est devenue possible grâce à la création d'instruments capables de mesurer l'atténuation du rayonnement.

Lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique traverse une cuvette contenant un composé en solution, l'intensité de la lumière incidente  $I_0$  est diminuée si le composé absorbe une certaine quantité de lumière  $I_A$ .



**Fig 11** : Principe de mesure de l'atténuation du rayonnement.

Si  $I_0$  représente l'intensité du rayon incident et  $I_T$  l'intensité de la lumière transmise, la transmittance  $T$  de milieu est définie comme la fraction du rayonnement incident qui est transmise par ce milieu, elle est définie comme suit :

$$T = \frac{I_T}{I_0}$$

L'absorbance  $A$  d'une solution est définie par l'équation:  $A = -\text{Log}T = \text{Log} \frac{I_0}{I_T}$

On remarque que, au contraire de la transmittance, l'absorbance augmente avec l'augmentation de l'atténuation.

L'absorbance d'un rayonnement monochromatique est proportionnelle au trajet optique dans le milieu et à la concentration de l'espèce absorbante selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

$c$  : Concentration de l'espèce absorbante (mol/l),

$l$  : Trajet optique (cm),

$\varepsilon$  : Coefficient d'absorption molaire ( $L \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

Cette loi, peut être appliquée aussi dans le cas des mélanges contenant plus d'une substance absorbante, à condition qu'il n'y ait aucune interaction entre les diverses espèces. L'absorbance est additive dans ce cas selon l'équation :

$$A_T = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \varepsilon_3 c_3 l + \dots \varepsilon_n c_n l$$

$$A_T = l \times \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i$$

## I. 10. Limite de la loi de Beer Lambert

La loi de Beer-Lambert ne décrit correctement les propriétés d'absorption que pour les solutions diluées ; en ce sens c'est une loi limite . Ainsi, aux concentrations supérieures à 0.01 mol/L, les interactions électrostatiques modifient le coefficient d'absorption molaire . D'autres facteurs contribuent à cette limitation, comme la présence de lumière parasite, ou la présence de particules qui dispersent la lumière. Aussi cette loi ne s'applique pas aux rayonnements polychromatiques.

Les méthodes d'analyses quantitatives du l' $\alpha$ -tocophérol par spectroscopie en UV-Visible étaient toujours sujettes à des critiques à cause des interférences qui peuvent exister avec d'autres solutés dans les échantillons réels comme l'huile d'olive. Par contre l'utilisation du spectrophotomètre UV reste une nécessité majeure pour déterminer avec précision les concentrations des solutions des composés de vitamine E purs. Pour quantifier l' $\alpha$ -tocophérol dans son échantillon réel, il faut le séparer. Pour éliminer toute interférence, le système RP-HPLC avec un détecteur UV offre cet avantage [42].

## **Chapitre II**

# **Méthodes de dosage de la vitamine E**



## **II .1.Problématique**

Due aux faibles niveaux de détection exigés par la réglementation et la nature complexe des matrices dans lesquelles les composés d'intérêt sont présents, la préparation d'échantillon, la détection et l'identification des composés à des niveaux de traces sont des aspects importants des méthodes analytiques [43-44].

Malgré l'avancé des techniques analytiques, les échantillons sont trop complexes pour être analysés sans étape préalable de traitement de l'échantillon. Cette dernière permet à la fois de fournir un extrait enrichi en composés mais aussi de minimiser au maximum la présence d'interférents lors de la détection finale. Leur présence peut rendre en effet plus difficile l'analyse des composés d'intérêt. La préparation de l'échantillon comprend en général l'extraction, la concentration et éventuellement une purification.

L'extraction doit être menée avec précaution lors de l'analyse de matrices complexes pouvant contenir des interférents. Leur élimination représente une étape primordiale du processus analytique global. Par ailleurs, le traitement de l'échantillon avant l'analyse chromatographique constituait deux tiers du temps total et représentait une des principales sources d'erreurs sur les résultats de mesure. Ces procédures occupent donc une majeure partie de la durée globale de l'analyse et contribuent fortement à son coût. De plus, ces étapes influent considérablement sur la fiabilité et l'exactitude des résultats [45-46], ce qui se traduit par la nécessité de contrôler le processus analytique global.

## **II.2. Traitement de l'échantillon**

### **II.2.1. Les procédés d'obtention**

Les vitamines (vitamine E) sont de nos jours largement utilisées dans les domaines de l'agroalimentaire et de la pharmacologie. L'identification et la quantification des vitamines (vitamine E) varient selon la substance analysée (cultivar, variété, etc.) mais surtout suivant la technique d'analyse utilisée.

En effet, diverses méthodes sont envisageables pour l'analyse des vitamines. Les techniques d'extraction et de pré-concentration les plus typiquement employées sont

l'extraction liquide-liquide [47], les techniques d'espace de tête statique [48] et d'espace de tête dynamique [49].

### II.2.2. L'extraction liquide-liquide (ELL)

C'est une méthode d'extraction utilisant des solvants, des composés organiques d'un mélange complexe en phase aqueuse. Les solvants sont utilisés seuls ou en combinaison. Le mélange complexe à partir duquel on souhaite extraire les produits est introduit dans une ampoule à décanter (Ependorff) en présence du solvant, ensuite par agitation, les constituants du mélange sont partagés entre les phases aqueuse et organique.

Cette dernière est récupérée et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. L'évaporateur rotatif est généralement remplacé par un système concentrateur-évaporateur qui ne nécessite pas le recours à une aspiration sous vide et donc limite les pertes de produits volatils [50]. Ces techniques ont fait l'objet de différents travaux qui décrivent leur optimisation et leur application aux jus de fruits [51-52].

### II.3. Méthodes de séparation

L'analyse de la vitamine E dans l'extrait brut est réalisée au moyen de techniques chromatographiques, principalement [53] :

- ✚ La chromatographie sur couche mince (*Thin Layer Chromatography*, TLC) ;
- ✚ la chromatographie en phase gazeuse (*Gas Chromatography*, GC);
- ✚ la chromatographie liquide de haute performance en phase normale (HPLC en phase normale);
- ✚ la chromatographie liquide de haute performance en phase inversée (HPLC en phase inverse) ;
- ✚ l'électrochromatographie capillaire (*Capillary Electrochromatography*, CEC).

Parmi ces méthodes de chromatographie, la chromatographie sur couche mince est la méthode la moins coûteuse en terme d'appareillage et d'instruments. Elle est utilisée pour la préparation des échantillons, leur purification, la détermination qualitative des antioxydants et l'estimation grossière des quantités contenues dans l'échantillon. Depuis l'apparition de la chromatographie liquide à haute performance, cette dernière est largement utilisée pour l'analyse des antioxydants liposolubles.

La chromatographie en phase liquide a en effet surpassé la chromatographie en phase gazeuse, car elle nécessite une préparation des échantillons moins fastidieuse et des conditions de température de colonne moins élevées, ce qui évite la perte de composés labiles [54].

### **II.3.1. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

La HPLC est une technique de séparation très puissante, elle est très utilisée dans de nombreux secteurs d'activités tels l'agriculture, l'agroalimentaire, l'industrie chimique et pharmaceutique, les cosmétiques, etc.

C'est une méthode physico-chimique basée sur les différences d'interactions entre les molécules à séparer et les phases mobile et stationnaire. Préalablement, les solutés sont mis en solution dans la phase mobile (solvant). Après son injection, ce mélange passe sous haute pression au travers de la colonne (tube en acier inoxydable) qui renferme la phase stationnaire. Celle-ci est constituée de micro particules de silice, elle est très sensible aux impuretés, il est donc essentiel de purifier et de filtrer l'échantillon avant son injection en tête de colonne (utilisation de pré-colonnes).

La phase stationnaire interagit plus ou moins selon la nature des molécules de solutés, ce qui permet leur séparation. Selon leur affinité, elles se répartissent entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les mécanismes d'échange sont basés sur les coefficients de partage.

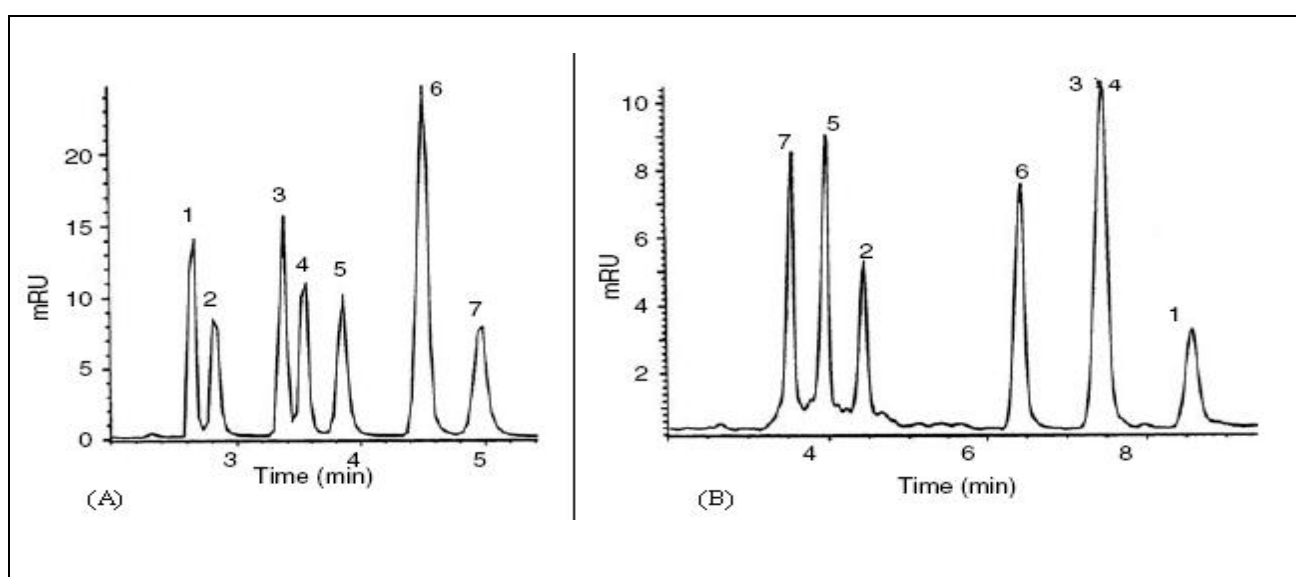
Les diverses molécules sont éluées à des instants différents en fonction de la polarité de la phase mobile, ces temps sont dits de « rétention », ils dépendent donc de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile et des conditions analytiques. Les composés sont identifiés grâce à un détecteur (absorptiométrique, réfractométrique, fluorimétrique, etc...) qui enregistre un signal et le transmet sous forme de pic. Si la séparation est satisfaisante, chaque pic représente un constituant du mélange à séparer. Le chromatogramme représente l'ensemble des pics enregistrés [55].

Il existe plusieurs types de phases stationnaires mettant en jeu des mécanismes de rétention différents, tels la chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion, etc... Ils dépendent de la nature des forces ou des phénomènes régissant la distribution du soluté entre les deux phases.

La chromatographie de partage est la technique la plus couramment utilisée. La phase stationnaire est composée d'un support (gel de silice) imprégné avec un liquide convenable ou greffée de motifs organiques variés. La séparation est fondée sur le partage des solutés entre

la phase greffée et la phase mobile : elle dépend des différences de solubilité des solutés dans les deux phases liquides. Actuellement, les phases greffées sont les plus employées.

On distingue : la chromatographie de partage classique (“normal phase chromatography”) dans laquelle les molécules greffées ont un groupement polaire (NH<sub>2</sub>, -CN), la phase mobile est peu polaire (hexane pur ou en mélange avec un peu de méthanol ou d’acétonitrile) et, la chromatographie de partage à polarité de phase inversée (“reversed phase chromatography”) où les molécules greffées sont apolaires (principalement des chaînes hydrocarbonées), la phase mobile est polaire, elle est composée de mélanges hydroalcooliques (eau-méthanol ou eau-acétonitrile) [55].



**Fig.12 : Analyse des tocophérols et tocotriénols par chromatographie liquide de haute performance en phase normale (A) et en phase inversée (B). 1 correspond à l’ $\alpha$ -tocophérol, 2 à l’ $\alpha$ -tocotriénol, 3 au  $\beta$ - tocophérol, 4 au  $\gamma$ -tocophérol, 5 au  $\alpha$ -tocotriénol, 6 au  $\delta$ -tocophérol et 7 au  $\delta$ -tocotriénol [56].**

La HPLC présente de nombreux avantages d’application : l’étude de constituants peu ou pas volatils, elle combine vitesse d’analyse, sensibilité et résolution performante. L’analyse se fait généralement à température ambiante ce qui évite les réarrangements thermiques des composés durant la séparation (composés thermosensibles).

Les analytes ne sont pas détruits en sortie du détecteur ce qui permet de les récupérer éventuellement pour des analyses ultérieures ou pour purifier des mélanges (chromatographie semi-préparative ou préparative) [55].

La séparation des tocophérol par HPLC est conduite de différentes manières selon les auteurs (fruit étudié, extraction, type de colonne, solvant, gradient, etc...). Les extraits peuvent être analysés directement après filtration [57, 58, 55].

Mais cette pratique est utilisable uniquement pour les fruits dont le jus est obtenu facilement. C'est pourquoi, l'analyse des tocophérol par HPLC est souvent précédée d'une extraction liquide-liquide. Les travaux publiés par Justesen et coll [59], par Escarpa et Gonzalez [60] et par Careri et coll., [61] décrivent l'utilisation du méthanol comme solvant. Ainsi, les extraits sont dissous dans du méthanol puis conservés après filtration, avant son analyse en HPLC.

## II.4. Techniques de détection

Les différentes Méthodes évoquées ci-dessus permettent la séparation des molécules. Pour finaliser la chromatographie, il faut détecter celles-ci. Dans le cas de la technique de HPLC, il existe plusieurs méthodes de détection [53] :

- détecteur à diffusion de lumière (ELSD : *evaporative light-scattering detection*) ;
- détecteur ultraviolet (UV : *ultraviolet absorbance detection*) ;
- détecteur de fluorescence (FL : *fluorescence detection*) ;
- détecteur électrochimique (ED : *electrochemical detection*).

Parmi ces techniques, l'ED est reconnue comme étant la plus sensible et s'est révélée être très utile pour l'analyse des antioxydants séparés par HPLC en phase inverse. Elle ne peut cependant être couplée avec une HPLC en phase normale en raison d'une incompatibilité entre les phases mobiles non aqueuses de la HPLC en phase normale et les interfaces utilisées avec le détecteur électrochimique. La HPLC-ED en phase inverse constitue donc jusqu'à présent la méthode la plus spécifique et la plus sensible pour les composés tocophérols et tocotriénols. Ceux-ci peuvent être détectés avec une sensibilité de l'ordre du pico gramme. En ce qui concerne les autres techniques de détection, leur sensibilité respecte l'ordre suivant : ED → FL → UV → ELSD.

Une perte de sensibilité de 10 à 20 fois s'observe en passant de la technique ED à la technique FL. Cette dernière est néanmoins largement employée, car elle est d'une utilisation plus simple et est compatible tant avec une HPLC en phase normale qu'avec une HPLC en phase inverse. Elle

présente une sensibilité et une spécificité plus grandes que celles de la technique UV, mais possède le désavantage de ne pas détecter les formes estérifiées de la vitamine E à l'inverse

du détecteur ultraviolet. Une perte de sensibilité de  $10^3$  à  $10^4$  s'observe lorsqu'on passe de la technique ED à la technique UV [53].

## **II.5. Dosage de la vitamine E par HPLC en phase inverse**

### **II.5.1. Principe de la méthode**

Pour réaliser une séparation d'un mélange on le fait diluer dans un solvant approprié, puis on injecte un volume connu dans le système chromatographique à travers la boucle d'injection. Les composés du mélange sont transportés par la phase mobile dont laquelle ils sont solubles vers la colonne siège de la phase stationnaire. Sous l'influence des deux effets antagonistes : effet d'entraînement exercé par la phase mobile, effet de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont séparés. Cette séparation est basée sur la différence d'affinité des composés du mélange vis à vis de la phase stationnaire, le constituant qui a plus d'affinité sera le plus retenu.

Au niveau de détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal, ce dernier est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme [55].

## II.5.2. Description du système RP-HPLC utilisé



**Fig.13:** Système HPLC du Laboratoire de Recherche « Spectrochimie et Pharmacologie Structurale ».

Le système se compose de :

### - Réservoirs de la Phase mobile

Les solvants utilisés comme phase mobile en chromatographie de partage sur phase stationnaire apolaire, doivent répondre aux certains exigences qui sont comme suite :

- Pureté

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2  $\mu\text{m}$ , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

- Compatibilité avec le système de détection

Il faut utiliser des solvants qui n'absorbent pas à la même longueur d'onde que l'analyte. Les limites de détection des solvants utilisés comme phase mobile dans l'étude de la vitamine E, sont très inférieures à 292 nm qui est la longueur d'onde maximale d'absorption de la vitamine E.

- Miscibilité des solvants

Si la phase mobile est constituée d'un mélange de solvants, ceux-ci doivent être complètement miscibles. En plus le soluté à séparer doit y être soluble.

- **Dégazeur DGU-14A, N° 228-35359-9, Shimadzu**

Afin d'assurer une analyse stable à tout moment, la phase mobile devra être dégazée. La phase mobile passe à travers une tuyauterie spéciale faite de films de résine.

Le dégazage est réalisé par réduction de la pression entourant cette tuyauterie. Cet élément peut dégazer séparément, jusqu'à 4 lignes.

- **Unité de gradient FCV-10ALvp, Shimadzu, N° 228-39500-91**

Elle permet de réduire au minimum le volume mort et de réduire le délai de gradient. Autant que possible, l'unité devrait être installée avant la pompe. L'unité de gradient basse pression peut commuter jusqu'à 4 phases mobiles.

- **Pompe LC-10ADvp, Shimadzu**

C'est une pompe d'échange à deux têtes ayant de petites chambres (10 µL. par course), Cette pompe permet de déplacer la phase mobile avec deux pistons qui fonctionnent en alternance, et des clapets anti-retour, qui sont synchronisés avec la commande de piston pour remplir et vider la phase mobile de chaque chambre. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum. Cette pompe peut livrer un débit constant de 0,001 à 9,999 mL par minute, avec des pressions allant de 10 à 392 bars. La gamme de température de fonctionnement est de 4 à 35°C.

- **Mixeur, N° 228-28000-91**

Il s'agit d'un accessoire qui permet de mélanger efficacement la phase mobile dans le cas d'élution en mode gradient.

- **Injecteur**

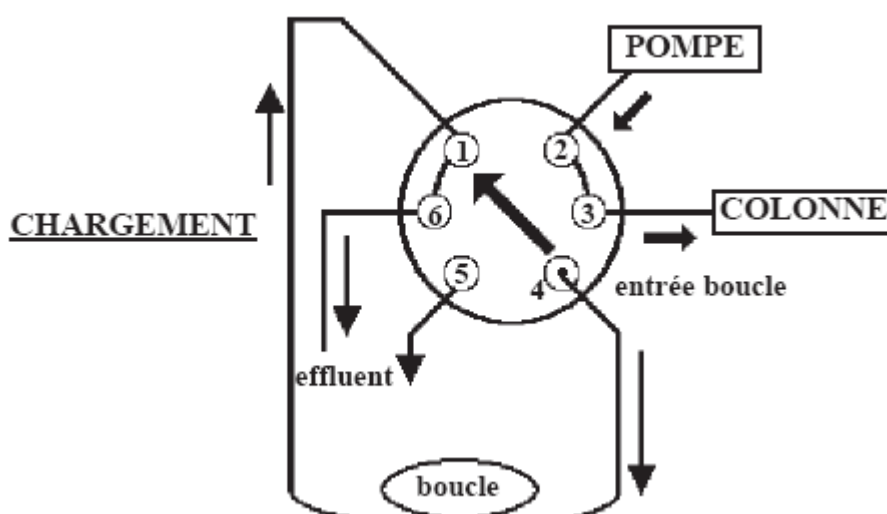


Comme la pression dans le circuit pompe-colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe, cette boucle contient deux positions :

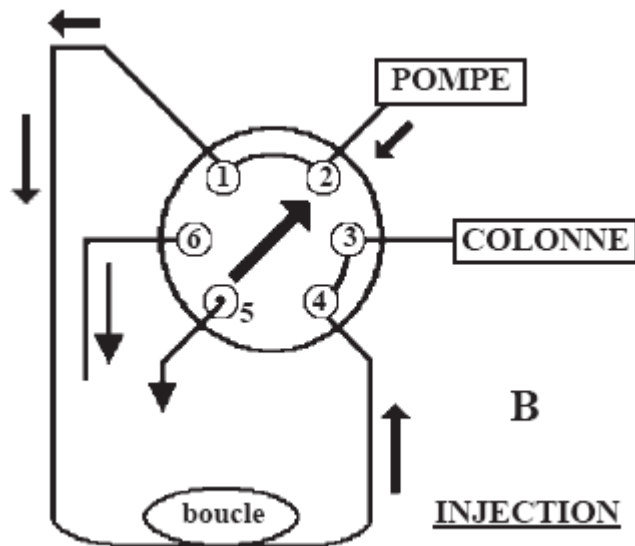
\* **LOAD** (charger) : On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. L'excès du liquide injecté est évacué par l'ouverture de vidange.

\* **INJECT** (injecter) : En tournant la valve vers cette position, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne à travers la phase mobile. Dans cette position, on peut rincer les canaux des déviations de la vanne ; le solvant du lavage est évacué par une autre ouverture de vidange. Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

a)



b)



**Fig.14:** Schéma simplifié d'une vanne à boucle externe et de son fonctionnement.

#### - Colonne de garde

Une colonne de garde peut être placée entre le dispositif d'injection et la colonne analytique. Comme son nom l'indique, cette dernière est utilisée pour protéger la colonne analytique contre la perte d'efficacité, qui peut être provoquée par la présence de matière particulaire. Elle doit être remplie avec la même phase stationnaire que celle de la colonne analytique.

#### - Colonne analytique : RP-HPLC

Elle est constituée par un tube en acier inoxydable rempli par une phase stationnaire, qui se compose de greffons organiques apolaires (octadécyle C18), fixés sur des particules de silice. C'est une phase inverse, RP-HPLC (Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography). La qualité de la séparation dépend de la géométrie de la colonne, de la granulométrie des particules qui constituent la phase stationnaire et de la qualité du remplissage. Cet élément représente le noyau du système chromatographique. Les caractéristiques de la colonne utilisée sont les suivants :

Longueur = 25 cm.

Diamètre interne = 4,6 mm.

Diamètre des particules = 5 µm.

- **Détecteur SPD-10Avp, Shimadzu**

C'est un détecteur UV-Visible, dispersif à longueur d'onde variable. Il mesure l'absorbance pendant l'élution de l'échantillon de la colonne. Il offre deux modes de détection, détection à longueur d'onde fixe ou détection en mode duel, La source utilisée est une lampe de deutérium, elle fournit la gamme de longueur d'onde 190 à 600 nm [34]. La longueur du chemin optique de la cellule est 10 mm, et son volume est 8 µL. La température de fonctionnement est 4 à 35°C

- **Système de traitement des données**

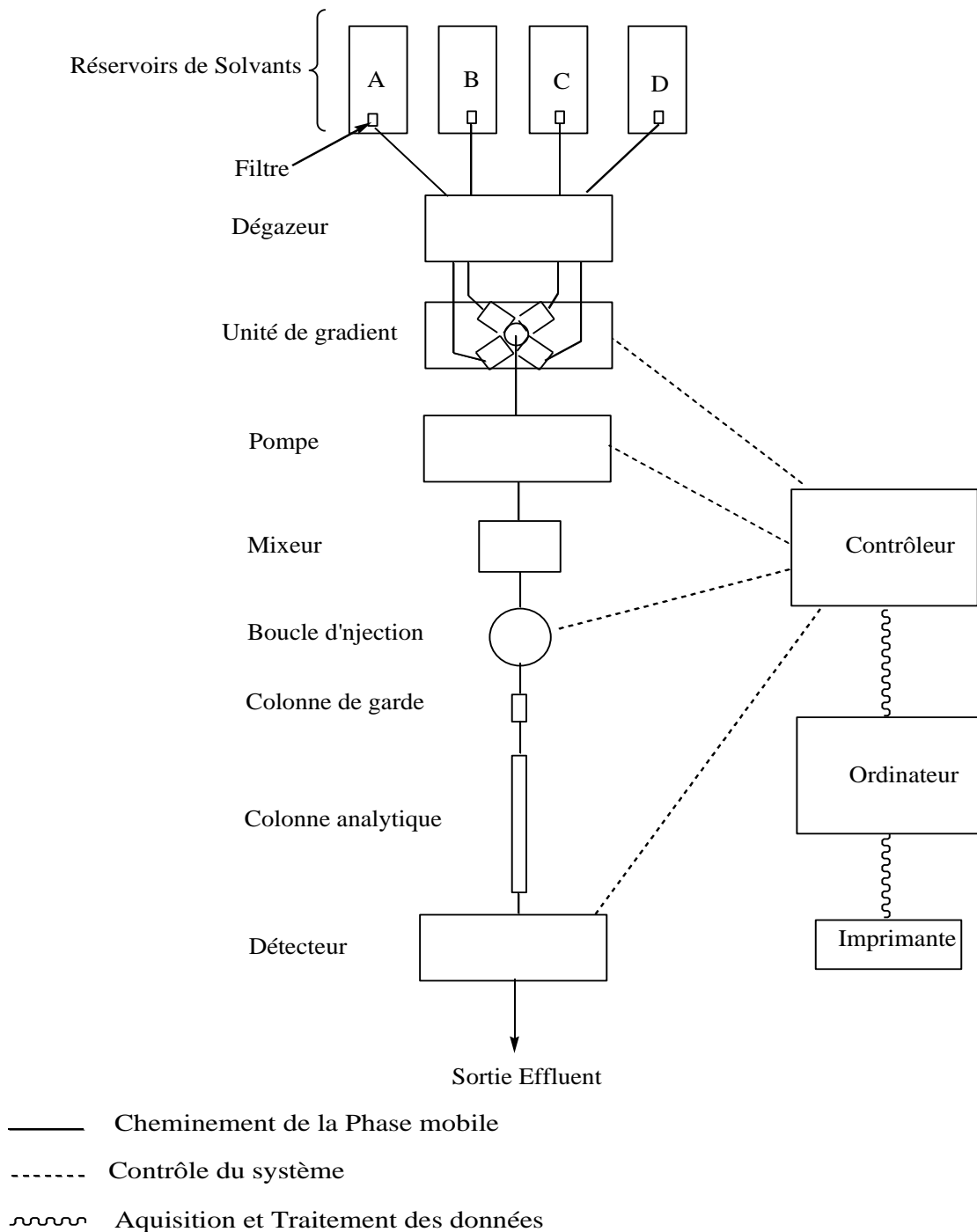
C'est un ordinateur menu du logiciel, LC solution. Celui-ci permet d'enregistrer et de visualiser le signal de sortie du détecteur du système HPLC. Les données traitées peuvent être imprimées. Le logiciel LCsolution offre deux types d'applications qui intègrent la plupart des fonctions pour l'analyse : analyse en temps réel et analyse en différé.

1. Analyse en temps réel (LC Real Time Analysis) :

Elle nécessite la mise en marche du système, et le contrôle en mode software grâce au logiciel LCsolution.

2. Analyse en différé (Post-run analysis) :

L'analyse est effectuée sans que le système soit relié. Cette option permet d'éditer des dossiers de méthodes ou des fichiers séquentiels pendant l'acquisition des données.



**Fig.15** : Diagramme du système HPLC utilisé [35].

### II.5.3. Mise en marche du système HPLC

- Vérifier les solvants,
- Mettre sous tension les compartiments du système dans l'ordre suivant :
  - Dégazeur,
  - Pompe,



## II.6. Analyse quantitative par Chromatographie Liquide Haute Performance RP-HPLC

### II.6.1. Principe

L'analyse quantitative en chromatographie à phase liquide est essentiellement une méthode comparative, elle est basée sur la relation reliant l'aire ( $A_i$ ) ou la hauteur ( $H_i$ ) du pic de l'analyte à sa concentration. Cette relation est établie par le détecteur qui mesure les variations des signaux selon les équations suivantes :

$$C_i = K_i \cdot A_i$$

$$C_i = K_i \cdot H_i$$

Avec

$K_i$  : coefficient de réponse du détecteur

La stabilité des conditions d'analyse laisse le coefficient constant, ce qui donne une linéarité entre la variation des paramètres et les différentes concentrations de l'analyte. Cette linéarité est la base des différentes méthodes qui permettent la détermination de la concentration d'un échantillon inconnu. Parmi ces méthodes, la méthode d'étalonnage qui est la plus utilisée en CPL. Son principe est de tracer une courbe représentant la variation de signal (aire ou hauteur) en fonction de la quantité d'analyte.

Cette courbe est traduite par l'équation :

$$y = a \cdot x + b$$

a: pente de la droite

b: ordonné à l'origine

Le dosage de l' $\alpha$ -tocophérol par RP-HPLC est généralement réalisé par la méthode **d'étalonnage externe ou interne** en mesurant l'aire de pic de l'analyte [55].

## II.6.2. L'étalonnage externe

Consiste à réaliser l'injection d'un volume reproductible et identique des solutions étalons, préparées avec des concentrations bien précises à partir du l'étalon de pureté connu. Les valeurs des aires des pics correspondants à chaque concentration sont représentées sur une droite d'étalonnage d'équation de type :

$$A_r = f(C_r)$$

Si cette droite est linéaire, son équation peut être écrite comme suit :

$$A_{\text{ét}} = a \cdot C_{\text{ét}} + b$$

Où :

$A_{\text{ét}}$  : Aire du pic de l'étalon pur,

$C_{\text{ét}}$  : Concentration de l'étalon pur,

a : Pente de la droite,

b : Ordonnée à l'origine.

Pour déterminer la concentration de l'analyte dans un échantillon inconnu, il suffit d'injecter le même volume de celui-ci après traitement, et dans les mêmes conditions .La concentration  $C_{\text{éch}}$  est calculée à partir de l'aire de pic obtenu ( $A_{\text{éch}}$ ) par deux manières :

✚ Soit par l'équation de la droite suivant la relation : 
$$C_{\text{éch}} = \frac{A_{\text{éch}} - b}{a}$$

✚ Soit par projection de la valeur d'aire sur la droite en utilisant un logiciel approprié.

La précision des résultats dépend :

✚ des pesées de la substance de référence et de l'échantillon.

✚ des dilutions, de la reproductibilité du volume de l'injection.

L'avantage de la méthode est que le volume de l'injection n'a pas une grande importance à condition qu'il demeure constant lors de l'étalonnage et l'analyse dans des conditions chromatographiques strictement invariantes [55].

### II.6.3. L'étalonnage interne

Consiste à ajouter une espèce appelée étalon interne aux solutions étalons et à l'échantillon. Ces solutions sont préparées à partir de la substance de référence, auxquelles on a ajouté une quantité connue constante de l'étalon interne. On injecte ces mélanges dans le système chromatographique, on construit la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée le rapport d'aire de l'analyte  $A_{ét}$  sur celui de l'étalon interne  $A_{int}$ , et en abscisse le rapport des concentrations de l'analyte  $C_{ét}$  et l'étalon interne  $C_{int}$ . Cette courbe est traduite par l'équation :

$$\frac{A_{ét}}{A_{int}} = f\left(\frac{C_{ét}}{C_{int}}\right)$$

Si cette droite est linéaire, son équation peut être écrite comme suit :

$$\frac{A_{ét}}{A_{int}} = a \cdot \frac{C_{ét}}{C_{int}} + b$$

Où :

$A_{int}$  : Aire du pic de l'étalon interne,

$C_{int}$  : Concentration de l'étalon interne,

$a$  : Pente de la droite,

$b$  : Ordonnée à l'origine.

Pour avoir la concentration de l'analyte dans l'échantillon inconnu, on ajoute une quantité connue de l'étalon interne lors de traitement de cet échantillon, puis on réalise une injection d'un volume reproductible dans les mêmes conditions de l'étalonnage. La concentration  $C_{éch}$  est déterminée à partir des deux aires obtenu ( $A_{éch}$  et  $A_{int(éch)}$ ) suivant la relation :

$$C_{éch} = \frac{\left(\frac{A_{éch}}{A_{int(éch)}}\right) - b}{a} \times C_{int(éch)}$$

Où :

$A_{int(éch)}$  : Aire du pic de l'étalon interne ajouté à l'échantillon,

$C_{int(éch)}$  : Concentration de l'étalon interne ajouté à l'échantillon.



Cette méthode dépend uniquement de la précision des pesés. Contrairement à la méthode par étalonnage externe ; elle ne dépend pas ni de précisions de dilutions ni du volume injecté, elle permet de s'affranchir de l'erreur commise sur ce volume [55].

En revanche, c'est une méthode laborieuse qui oblige à rechercher un étalon interne dont l'élution est compatible avec l'analyse envisagée, ce qui exige :

- ✚ qu'il soit d'une pureté connue et chimiquement inerte avec les solutés et la phase mobile,
- ✚ qu'il ait un temps de rétention différent de tous les constituants de l'échantillon, mais le plus proche possible de la substance à déterminer,
- ✚ que son coefficient de réponse pour le détecteur soit du même ordre de grandeur que celui du produit à déterminer
- ✚ qu'il ne soit pas présent comme impureté dans l'échantillon,
- ✚ qu'il soit ajouté à une concentration qui donne une aire de pic sensiblement équivalente à celle du produit à déterminer.

#### II.6.4. Détermination du degré de pureté de l' $\alpha$ -tocophérol

L'analyse quantitative d'une substance repose sur l'utilisation de cette dernière en grande pureté comme étalon, elle est fournie par des laboratoires spécialisés avec un degré de pureté de l'ordre  $\geq 98\%$ , mais ce degré est influencé par les conditions de commercialisation et de stockage donc il est nécessaire de le vérifier. Le test est effectué par la chromatographie à phase liquide. Le degré de pureté de chaque substance sera utilisé dans le calcul des concentrations de leurs solutions. Ce facteur est déterminé selon l'équation suivante :

$$d = \frac{A_x}{\sum_i^n A_i}$$

Où :

d : Degré de pureté.

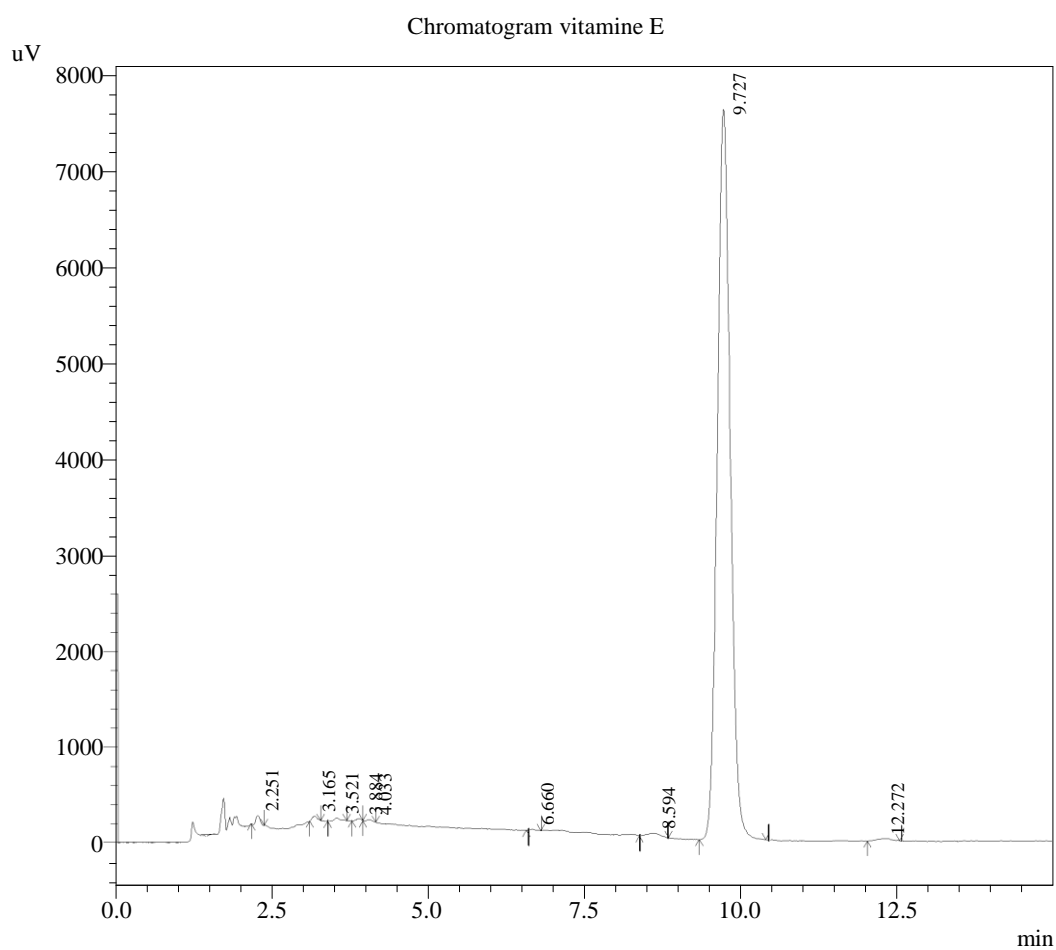
$A_x$  : Air du pic de la substance à analyser.

$A_i$  : Air du pic de la substance i détecté.

## Procédure

L' $\alpha$ -tocophérol commercial est obtenu de la compagnie Fluka dans un petit flacon en verre ambré de 25g, le test par spatule montre que c'est un solide visqueux de couleur jaune claire qui ne coule pas et qui colle, difficile à peser. La préparation des solutions stocks est faite par la manière suivante :

Par la spatule on fait un prélèvement d'une masse de l' $\alpha$ -tocophérol pure et diluer dans un volume de 10mL d'éthanol de grade HPLC. Avec la micropipette, on prend 0,2mL de cette solution et compléter à 10mL d'éthanol puis on mesure l'absorbance de cette solution en appliquant la « méthode scan » du spectrophotomètre. Cette absorbance va nous permettre de calculer les concentrations de la solution préparée en appliquant la loi de Beer Lambert. Pour vérifier la pureté de notre produit on injecte une solution de concentration un peu élevée dans le système chromatographique dans des conditions optimales[42].



PeakTable

SPD-10Avp Ch1 292nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.251	387	95	0.343	1.196
2	3.165	261	47	0.231	0.592
3	3.521	197	30	0.175	0.384
4	3.884	119	24	0.105	0.301
5	4.033	114	20	0.101	0.257
6	6.660	77	13	0.068	0.164
7	8.594	481	37	0.426	0.466
8	9.727	110928	7633	98.223	96.348
9	12.272	370	23	0.328	0.291
Total		112935	7922	100.000	100.000

**Fig.16** : Chromatogramme obtenu par injection d'une solution d' $\alpha$ -tocophérol

## II.6.5. Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'échantillon d'huile d'olive

L'identification est réalisée par HPLC, le principe est basé sur la comparaison de temps de rétention du pic de l'analyte dans l'échantillon d'huile d'olive avec celui de l'étalon pur [55].

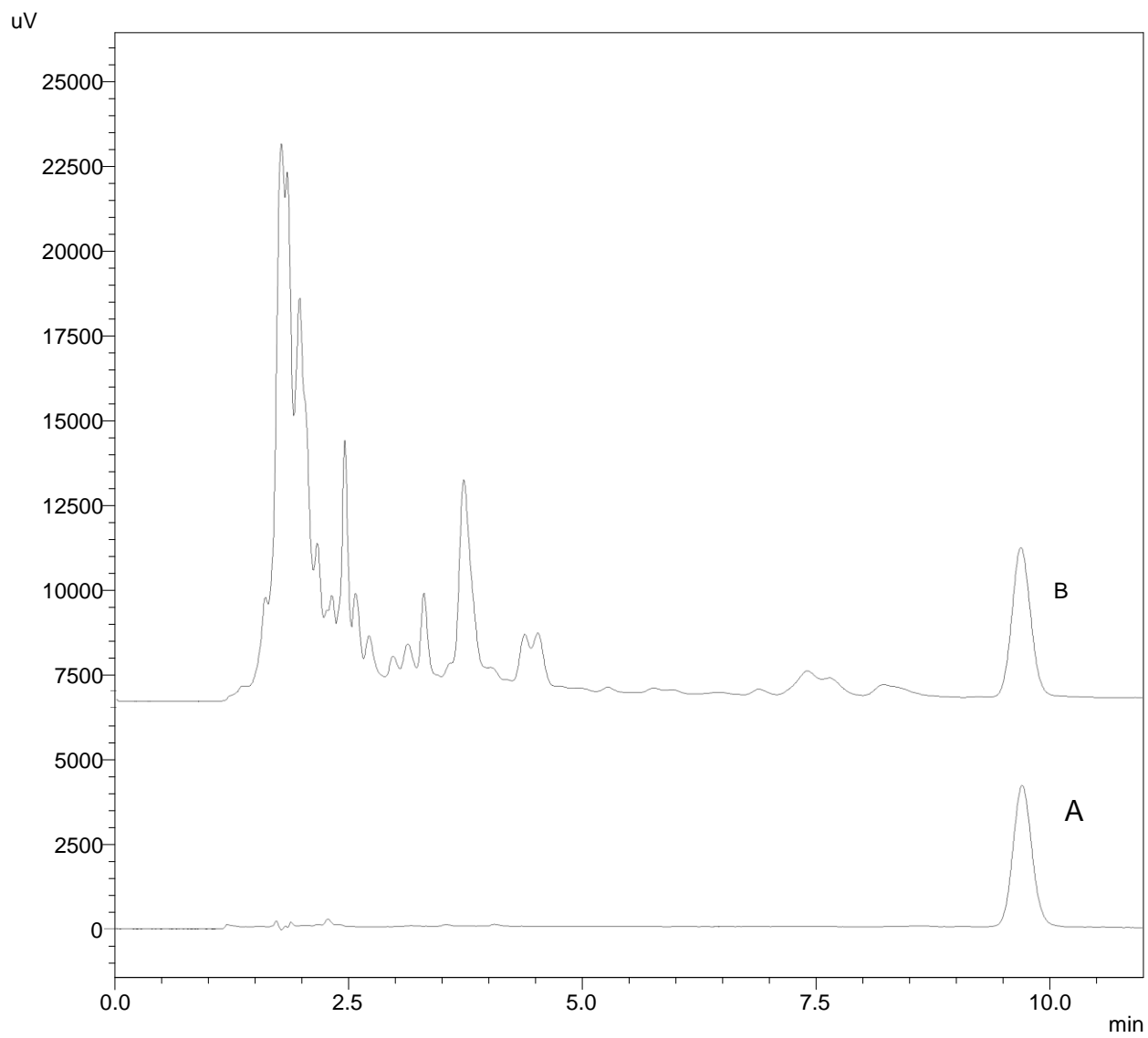
### Procédure

- Traiter 500 mg de huile d'olive, avec 500  $\mu$ L de la solution méthanol avec centrifugation à 13000 ppm pendant 5 min [63], puis on injecte un volume de 20  $\mu$ L de surnageant dans le système chromatographique dans les conditions suivantes :

- Mode d'élution : gradient linéaire
- Phase mobile : (70%  $\text{CH}_3\text{OH}$  ; 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$ )
- Débit 1,5 mL/min
- Détection : à  $\lambda = 292$  nm, atténuation à 0.005 AUFS,
- Temps d'acquisition : 11 min,
- La température de la salle est de 22 °C

Le chromatogramme suivant représente la comparaison des pics obtenus :

.

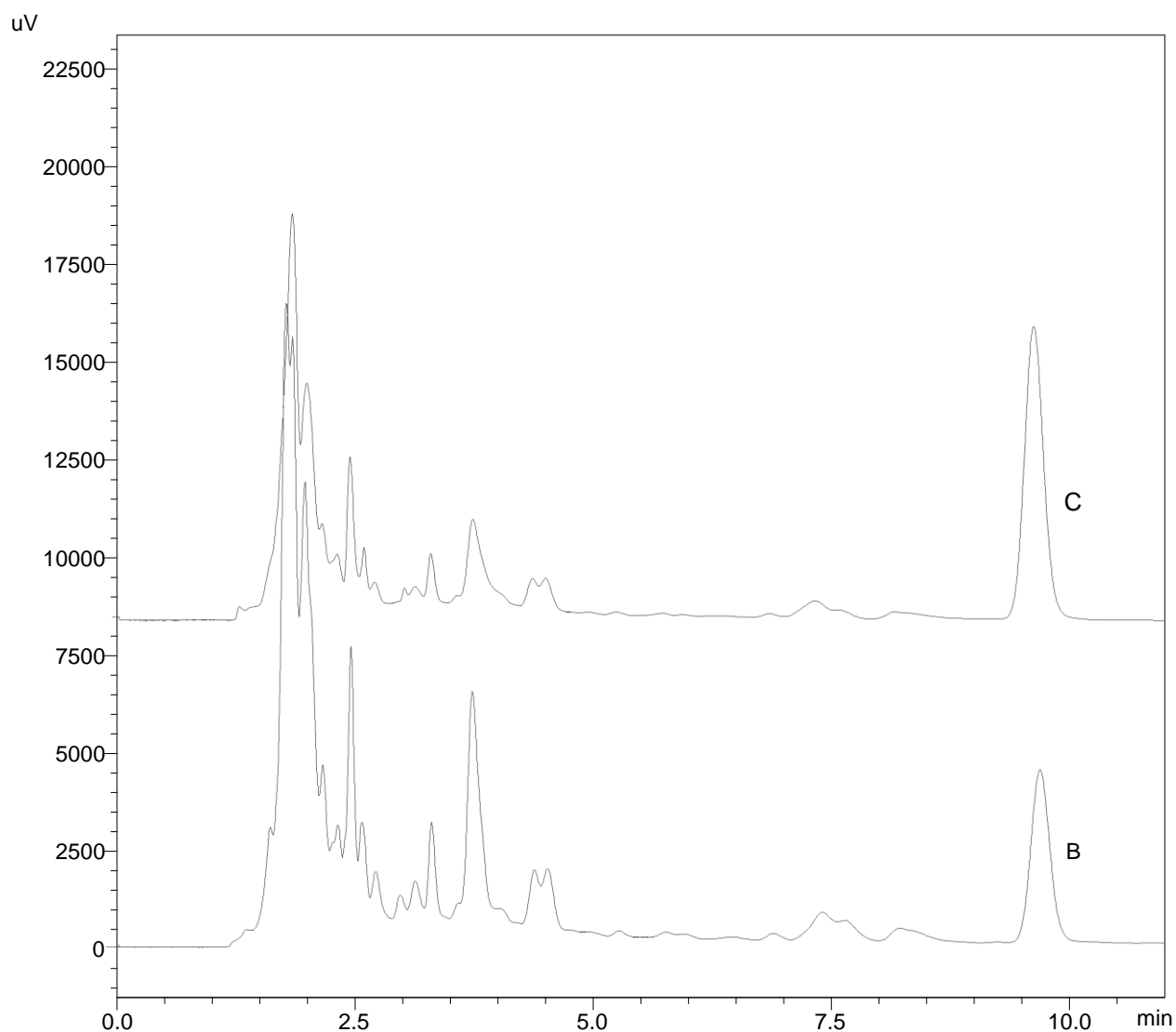


**Fig.17.** : Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol **A** : étalon pur. **B** : Echantillon d'huile d'olive traité

## II.6.6. Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'échantillon d'huile d'olive dopé avec l'étalon pur

L'identification est réalisée par HPLC, le principe est basé sur la comparaison de temps de rétention du pic de l'analyte dans l'échantillon d'huile d'olive avec la même échantillon dopé avec l'étalon pur [55].

Le chromatogramme suivant représente la comparaison des pics obtenus :



**Fig.18** : Identification du pic de l' $\alpha$ -tocophérol **B** : Echantillon d'huile d'olive dopé .**C** : Echantillon d'huile d'olive non dopé

## II.6.7. Préparation de la droite d'étalonnage externe

### II.6.7.1. Matériels et réactifs

- 2 fiole jaugée de 10 ml. (pour les solutions de l' $\alpha$ -tocophérol)
- 1 fiole jaugée de 50 ml,
- Micropipettes (50-200 $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L)
- 2 béchers de 25 ml,
- 5 flacons de 15 ml,
- Tubes Eppendorf,
- Papier d'aluminium,
- Spectrophotomètre UV-Visible,
- Cuvette en quartz,
- Ethanol qualité HPLC,
- Solution stock de l' $\alpha$ -tocophérol ( $C = 2955,5 \mu\text{mol/L}$ ),

### II.6.7.2. Préparation des solutions primaires

- ✚ Prélever avec la micropipette 0.2 ml de la solution stock de l' $\alpha$ -tocophérol et compléter le volume de la fiole jaugée de 10 mL avec l'éthanol qualité HPLC,
- ✚ Transférer la solution dans un flacon de 15 ml, emballer avec du papier aluminium, étiqueter et stocker au frais.

### II.6.7.3. Préparation des solutions secondaires

- ✚ Rincer les fioles jaugées plusieurs fois avec l'éthanol absolu,
- ✚ Prélever 0,05 mL, de la solution primaire de l' $\alpha$ -tocophérol avec la micropipette et compléter le volume de la fiole jaugée de 10 mL avec la solution de l'éthanol,
- ✚ Transférer les solutions dans des flacons de 15 mL, emballer avec du papier aluminium, étiqueter et stocker au frais.

Refaire la même préparation des deux solutions avec l'éthanol absolu, pour confirmer les concentrations par test UV [21] qui est comme suit :

- ✚ A partir de menu charger l'option "fixed",
- ✚ Commander la lecture de l'absorbance à une seule longueur d'onde, entrer la valeur de l'absorbance maximale pour la solution analysée (l' $\alpha$ -tocophérol:292 nm) et valider,
- ✚ Sauvegarder la méthode dans la librairie,
- ✚ Remplir le  $\frac{3}{4}$  du volume de la cuvette de quartz par l'éthanol absolu,

- ✚ Placer la cuvette dans l'appareil et appuyer sur le bouton « Zéro base »
- ✚ Rincer la cuvette avec une petite quantité de la solution à analyser et remplir ensuite  $\frac{3}{4}$  de son volume par la même solution,
- ✚ Essuyer avec un papier doux les parois externes de la cuvette, si nécessaire imbiber le papier avec une goutte d'éthanol,
- ✚ Lancer le test en appuy sur le bouton « run », la valeur de l'absorbance s'affichera sur l'écran,
- ✚ Répéter l'opération trois fois pour avoir trois lectures d'absorbance pour chaque solution analysée,
- ✚ Sauvegarder les valeurs de l'absorbance  $Abs_1$  ;  $Abs_2$  et  $Abs_3$  affichées sur l'écran pour calculer les concentrations.

#### II.6.7.4. Préparation des solutions étalons

##### ➤ Préparation des solutions étalons pour tracer la droite d'étalonnage

- ✚ préparer les solutions étalons dans 5 tubes eppendorf différents on combinant les volumes des solutions secondaires comme suit :
  - 0 ; 66 ; 132 ; 198 ; 264 ; 330  $\mu$ L de solution de l' $\alpha$ -tocophérol,
  - Compléter le volume à 400  $\mu$ L avec la solution de l'éthanol,
  - Fermer les tubes, emballer dans le papier aluminium, étiqueter et stocker au frais.
- ✚ mettre en marche le système HPLC selon les conditions suivantes :
  - mode d'élution gradient,
  - phase mobile  $CH_3OH/CH_3CN$  (70% :30%),
  - débit 1.5 mL/min,
  - volume d'injection 20  $\mu$ L,
  - longueur d'onde 292 nm,
  - atténuation 0,005 AUFS,
  - injecter les solutions étalons.



## II.6.8. Résultats

Les concentrations finales des solutions secondaires sont calculées d'après la loi Beer-Lambert et après détermination du degré de pureté de chaque substance par RP-HPLC, comme suit :

- Calcul de l'absorbance moyenne de la solution secondaire diluée dans l'éthanol :

$$\overline{Abs} = \frac{Abs_1 + Abs_2 + Abs_3}{3}$$

Détermination de la concentration finale :  $C_{Sec} = \frac{\overline{Abs}}{\varepsilon \cdot l} \times d$

Avec

$C_{Sec}$  : Concentration de la solution secondaire,

$\overline{Abs}$  : Absorbance moyenne,

$\varepsilon$  : Coefficient d'absorption molaire en ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ),  $\varepsilon = 3265$  pour les solutions de l' $\alpha$ -tocophérol .

$l$  : Epaisseur de la cuvette en cm.

$d$  : Degré de pureté.

**Tableau 10** : Résultats de l'analyse UV des solutions secondaires

	Absorbances			$D$ en (%)	Concentration en ( $\mu mol/L$ )
	$Abs_1$	$Abs_2$	$Abs_3$		
$\alpha$ -tocophérol	0,194	0,193	0,192	98,223	59 ,11

La concentration de la solution primaire de  $\alpha$ -tocophérol est déduite de celle de la secondaire selon l'équation de dilution suivante :

$$C_{Pr} \times V = C_{Sec} \times V_T$$

$$C_{Pr} = \frac{C_{Sec} \times V_T}{V}$$

Avec

$C_{Pr}$  : Concentration de la solution primaire,

$V$  : Volume de la prise diluée de la solution primaire,

$C_{Sec}$  : Concentration de la solution secondaire,

$V_T$  : Volume total de la solution secondaire préparée.

$$C_{Pr} = (59,11. \times 10) / 0.05 = 11822 \text{ } \mu\text{mol/L}$$

Les concentrations des solutions étalons sont calculées selon l'équation de dilution suivante :

$$C_{(étalon)} \times V_T = C_{Sec} \times V$$

$$C_{(étalon)} = \frac{C_{Sec} \times V}{V_T}$$

Avec :

$C_{(étalon)}$  : Concentration de la solution étalon,

$C_{Sec}$  : Concentration de la solution secondaire,

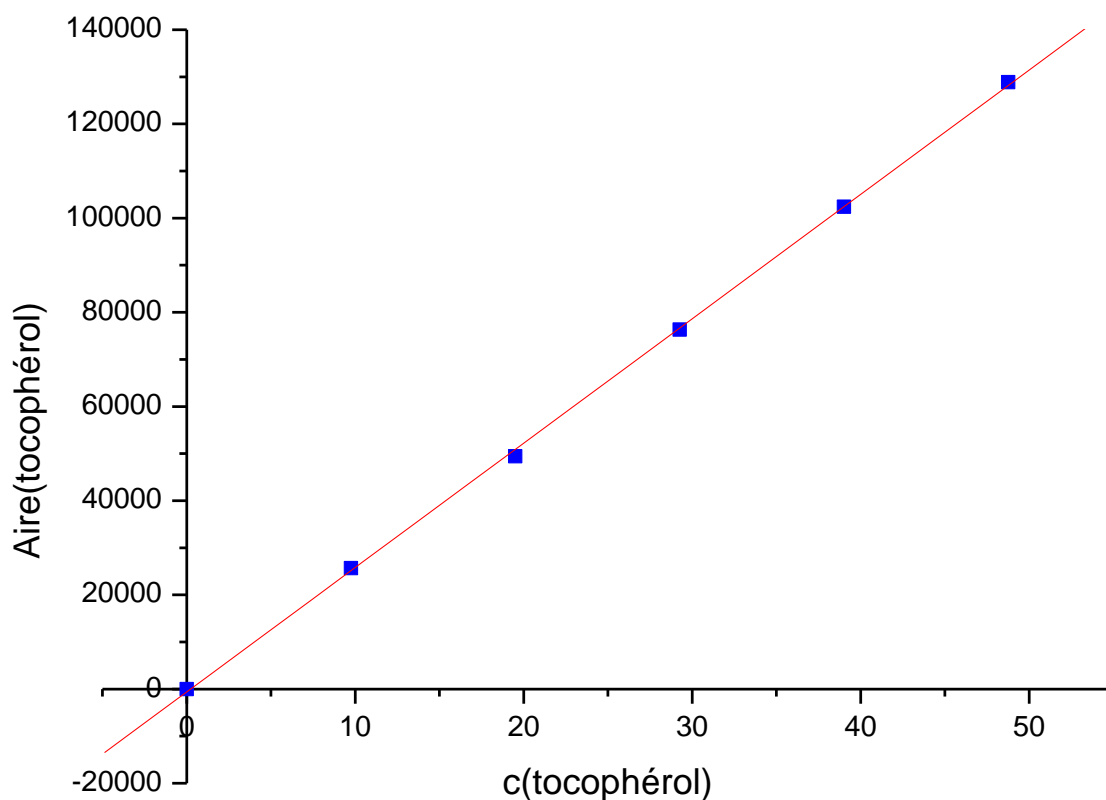
$V_T$  : Volume total de la solution étalon préparée ( $V_T = 400 \mu\text{L}$ ),

$V$  : Volume de la prise diluée de la solution secondaire.

**Tableau 11** : Résultats de l'analyse HPLC des solutions étalons

Etalon	Concentrations (umol/L)		Aires A	Hauteur
	$\alpha$ -tocophérol	$\alpha$ -tocophérol		
Blanc	0		0	0
1	9.753		25661	321
2	19.506		49420	651
3	29.260		76315	958
4	39.013		102435	1291
5	48.766		128866	1598

Les résultats cités dans le tableau précédant nous permettent de tracer la droite d'étalonnage externe en utilisant le logiciel « origine ». Cette courbe est représentée dans la figure suivante :



**Fig.19** : Droite d'étalonnage interne.

**Tableau 12:** Paramètres de la droite d'étalonnage externe

Equation de la droite	Coefficients	
	R	r <sup>2</sup>
$y = 2641,01 x - 613,00$	0,9998	0,9996

### II.6.9. Discussion

Les solutions primaires, secondaires et étalons de l' $\alpha$ -tocophérol sont préparés à ces concentrations indiquées qu'après une estimation théorique, cela dépend de la gamme voulue pour quantifier l' $\alpha$ -tocophérol dans l'huile d'olive.

La concentration 9,731  $\mu\text{mol/L}$  de tocophérol de la solution étalon du niveau 1, est choisie faible, elle correspondre à la borne inférieure du domaine de linéarité de la droite d'étalonnage.

La concentration 48,766  $\mu\text{mol/L}$  du niveau 5 est choisie pour englober un domaine acceptable du tocophérol d'huile d'olive.

## II.7. Linéarité

L'étalonnage a été effectué avec des solutions étalons d' $\alpha$ -tocophérol dont les concentrations variaient de 9,753  $\mu\text{mol/L}$  à 48,766  $\mu\text{mol/L}$ . La courbe d'étalonnage (aire du pic chromatographique en fonction de la concentration en  $\alpha$ -tocophérol) obtenue après régression linéaire des points expérimentaux, elle a présenté une bonne linéarité (coefficient de régression est de 0,9998) (Figure18).

Les paramètres ( $r$  et  $r^2$ ) obtenus, montrent une très forte corrélation entre les valeurs des rapports des aires et les rapports des concentrations utilisées pour tracer la droite d'étalonnage interne. Puisque ces paramètres sont des mesures de corrélation et ne pas de linéarité [28], il faut inspecter les points de la droite et chercher d'éventuelles courbures. L'outil de diagnostic puissant à cet effet et de tracer les résidus.

### -Représentation des résidus de régression

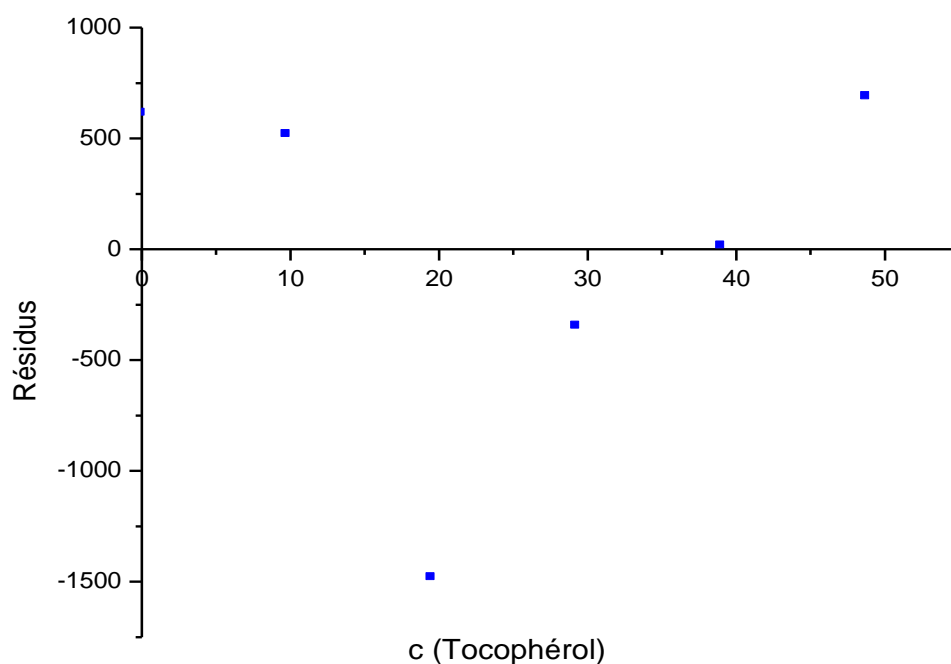
Une représentation des résidus de régression peut être facilement faite en reportant sur un graphique les valeurs établies selon la formule :  $y_i - \widehat{y}_i$

En cas de linéarité, les points obtenus doivent se répartir de façon aléatoire autour de la droite de fonction :  $X = 0$

**Tableau 13** : Calcul des résidus de la droite d'étalonnage interne

Etalon	$X_{i=\text{Tocophérol}}$	$Y_{i=\text{Tocophérol}}$	$\hat{y} = ax_i + b$	Résidus $y_i - \hat{y}_i$
blanc	0	0	- 613,008	613,008
2	9,753	25661	25144,801	516,198
3	19,506	49420	50902,611	-1482,611
4	29,260	76315	76663,061	-348,061
5	39,013	102435	102420,87	14,128
6	48,766	128866	12817,680	687,32

On obtient une représentation des résidus de régression donnée par le graphique suivant :



**Fig.20** : Distribution des résidus en fonction des rapports des concentrations

-

## **Chapitre III**

### **Dosages des échantillons d'huile d'olive**

#### **par RP-HPLC**

### III.1. Dosages des échantillons d'huile d'olive

#### III.1.1. Nature des échantillons

Les échantillons d'huile d'olive sont collectés à partir d'unités d'extraction localisées dans plusieurs régions oléicoles. Ces huiles sont classées selon leur provenance et leur procédé d'extraction. L'étude a porté sur 15 échantillons prélevés durant la saison 2010/2011 et répartis comme suit :

- Huit (8) échantillons provenant de la wilaya de TLEMCEM, (1)
- Deux (2) échantillons de la wilaya de MASCARA, (2)
- Un (1) échantillons de la wilaya de AINTMOUCHENT, (3)
- Un (1) échantillons de la wilaya de Tizi-Ouzou, (4)
- Un (1) échantillon de la wilaya de BEJAIA, (5)
- Deux (2) échantillons de wilaya de MOSTAGANEM

La carte topographique résume les différents sites de prélèvement



Figure 20 : Localisation des régions qui ont participé à l'étude

Chaque échantillon est prélevé à partir d'un échantillon global par homogénéisation et réduction de la masse appropriée qui est représentative du lot et destinée à l'analyse au laboratoire. Les échantillons d'huile d'olive sont mis dans des flacons en verre foncé propres et secs d'une taille minimale de 250ml muni de bouchon, et placé à l'abri de la lumière selon la norme AFNOR T60-280 (1987). Une étiquette est collée sur chaque flacon indiquant l'aire oléicole, le numéro de l'échantillon, la nature de l'huile (fraîche ou cuite) et le procédé d'extraction.

**Tableau 14** : Caractéristiques des échantillons d'huile d'olive

<b>Régions</b>	<b>Localité</b>	<b>Système d'extraction</b>	<b>Codage</b>
TLEMCEN	Nédroma	Centrifugation	S1/31
TLEMCEN	Nédroma	Centrifugation	S2/49
TLEMCEN	Nédroma	Presse	S2/50
TLEMCEN	Ghazaouet	Presse	S3/61
TLEMCEN	Fellaoucen	Centrifugation	S1/34
TLEMCEN	Beni Snous	Presse	S1/36
TLEMCEN	Sabra	Centrifugation	S3/59
TLEMCEN	Maghnia	Centrifugation	S3/63
MASCARA	Sig	Centrifugation	S1/37
MASCARA	Sig	Presse	S2/45
MOSTAGANEM	Sidi Ali	Centrifugation	S2/46
MOSTAGANEM	Ain tadles	Presse	S1/35
BEJAIA	Sadouk	Centrifugation	S3/58
Tizi-Ouzou	Azazga	Centrifugation	S2/47
AINTMOUCHENT	Béni Saf	Centrifugation	S3/60



### III.1.2. Traitement des échantillons

A partir du nombre total d'échantillons prélevés, on a une somme de 21 échantillons comme première tranche à analyser. Cette somme est répartie en trois séries de 7 échantillons, analysées indépendamment dans les mêmes conditions opératoires.

La première étape de processus analytique consiste en une préparation de l'échantillon avant l'analyse. La réalisation de cet étape dépend de deux performances :

- ✚ Le volume de la prise d'huile d'olive traité.
- ✚ Le solvant ou mélange de solvants pour l'extraction du l' $\alpha$ -tocophérol : Le bon choix est basé sur les conditions suivantes :

- Doit dénaturer les protéines,
- Doit avoir une polarité convenable et une affinité pour l'analyte pour éliminer une éventuelle co-précipitation pendant la dénaturation des protéines,
- Doit être complètement miscible avec l'échantillon,
- Doit être compatible avec le système de détection et ne pas interférer avec l'analyte.

Parmi les différents solvants et mélanges proposés dans la littérature pour ce type de méthode, le solvant CH<sub>3</sub>OH proposé par Michael Murkovica et Sonja Lechner [55] est le plus pratique et répond à notre but. Toutes les étapes de ce processus sont réalisées sous lumière rouge pour minimiser l'oxydation de l' $\alpha$ -tocophérol [65].

#### • Procédure

##### Préparation des échantillons d'huile d'olive

- Classifier les échantillons de la série à analyser sur la pailleasse.
- Préparer en double les tubes Ependorff, selon le nombre d'échantillons prévus,
- Etiqueter les tubes deux à deux,
- Peser 500 mg de premier échantillon dans le premier tube par une balance analytique.
- Refaire la même opération pour l'ensemble des échantillons de la série,
- Ajouter 500 uL de méthanol grade HPLC,
- Centrifuger à 13000 rpm, pendant 5 min.
- Prélever 200 uL de surnagent et transférer dans le deuxième tube placé dans un étui d'aluminium,

- Même opération pour l'ensemble des échantillons de la série, en changeant l'embout à chaque prélèvement,
- Ajouter 400  $\mu\text{L}$  de méthanol grade HPLC,
- Fermer le tube et agiter violemment avec la main, dans le sens vertical [66],
- Refaire la même opération pour l'ensemble des échantillons de la série,
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 1 minutes. Enlever les tubes de la centrifugeuse prudemment et les placer dans un endroit frais et noir. (Boite contenant de la glace),
- Mettre en marche le système HPLC,
- Prélever soigneusement le surnageant (à l'aide de la seringue conçue pour l'injection), sans toucher les parois du tube ou le précipité et charger la boucle d'injection,
- Injecter les échantillons

### III.1.3. Résultats

Les concentrations des échantillons de la 1<sup>ère</sup> série sont quantifiées par une droite d'étalonnage externe dont l'équation,  $y = 2684,502x + 246,650$ .

**Tableau 15** : Résultats de l'analyse RP- HPLC de la première série d'échantillons.

N°	Code	Aire de pic	Concentration	
		tocophérol	(umol/L)	(mg/100g)
1	1S/31	31371	11,594	2,996
2	QC1	28386	11,326	2,926
3	1S/37	30225	11,182	2,888
4	1S/34	60327	22,38	5,783
5	1S/35	3815	1,329	0,343
6	QC2	27605	11,024	2,848
7	1S/36	15324	5,616	1,451
Moyenne Ecart-type CV (%)		25095,428 9092,934 36,233	/	

Les concentrations des échantillons de la 2<sup>ème</sup> série, sont quantifiées par la droite d'étalonnage interne dont l'équation,  $y = 2641,014 x - 613,008$ .

**Tableau 16** : Résultats de l'analyse RP- HPLC de la cinquième série d'échantillons.

N°	Code	Aire de pic	Concentration	
		tocophérol	(umol/L)	(mg/100g)
1	2S/45	1493	0,797	0,205
2	QC1	31183	12,039	3,11
3	2S/46	41343	15,886	4,104
4	2S/47	32329	12,47	3,222
5	2S/49	52769	20,222	05,224
6	QC2	28341	11,308	2,922
7	2S/50	12239	4,886	1,262
Moyenne Ecart-type CV (%)		28532 15905,588 55,746/	/	

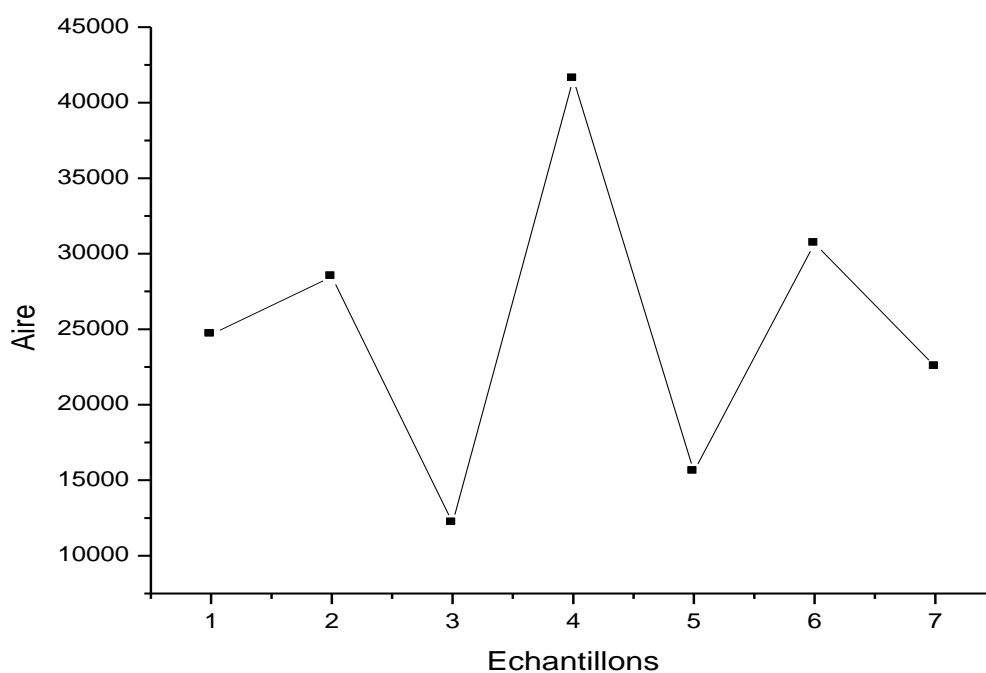
Les concentrations des échantillons de la 3<sup>ème</sup> série, sont quantifiées par la droite d'étalonnage externe dont l'équation,  $y = 2679,1587 x - 373,3180$ .

**Tableau 17** : Résultats de l'analyse RP- HPLC de la cinquième série d'échantillons.

N°	Code	Aire de pic	Concentration	
		tocophérol	(umol/L)	(mg/100g)
1	3S/58	12176	4,684	1,210
2	QC1	28479	10,769	2,782
3	3S/59	15580	5,954	1,538
4	3S/60	41584	15,660	4,046
5	3S/61	24655	9,334	2,412
6	QC2	30677	11,580	2,992
7	3S/63	22517	8,537	2,206
Moyenne Ecart-type CV (%)		28532 15905,588 55,746	/	

### III.1.4. Discussion

#### III.1.4.1 Distribution des aires des pics de l' $\alpha$ -tocophérol de la troisième série



**Fig.22.** : Distribution des aires des pics de l' $\alpha$ -tocophérol de la 3<sup>ème</sup> série.

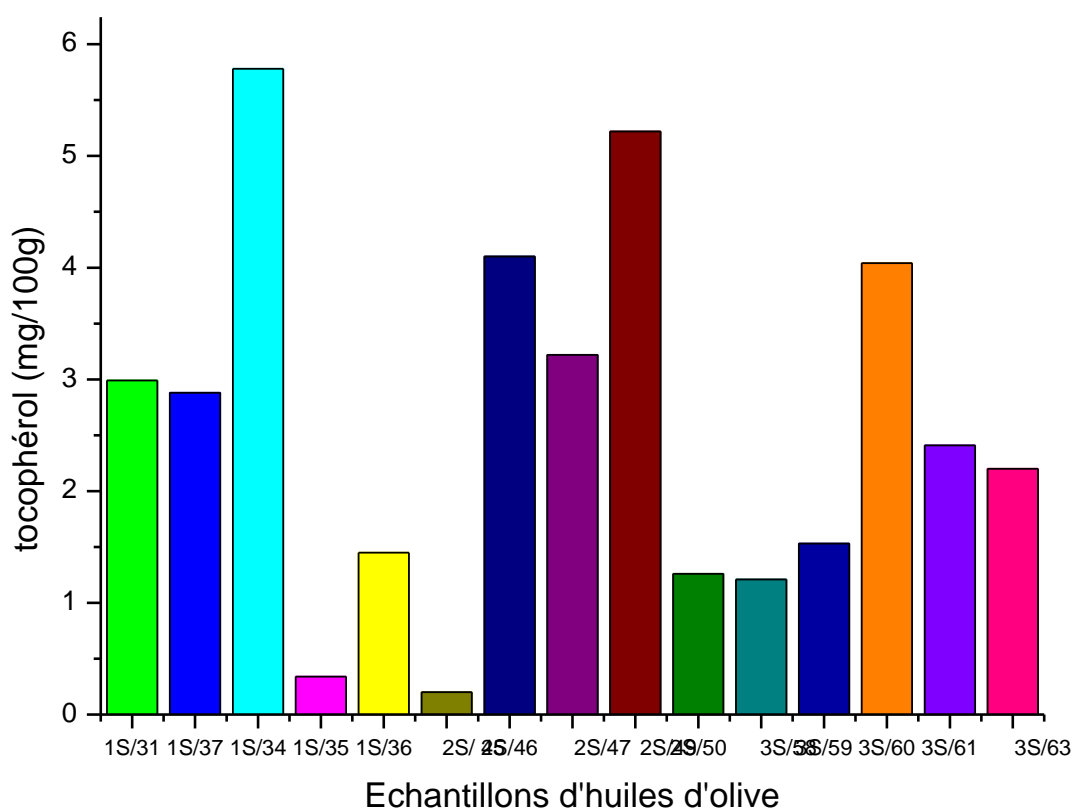
**Tableau 18** : Statistiques du spécimen de contrôle :

Code	Aire du pic	Concentration	
	Tocophérol	( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\text{mg}/100\text{g}$ )
QC1	30677	11,580	2,782
QC2	28479	10,679	2992
Moyenne	29578	11,129	2,887
E-type	1098,749	0,45	0,044
CV %	3,714	0,043	0,015

Le spécimen de contrôle est un échantillon d'huile d'olive qui est injecté dans deux temps différents. L'aire de pic pour la deuxième injection est la plus basse. La valeur de l'aire donne un CV=3,714% qui est un peu élevé mais reste acceptable. Cette variation est due à une faute de dilution ou d'injection.

### **III.1.4.2. Evaluation des teneurs en vitamine E des échantillons analysés**

La fraction de tocophérol a consisté essentiellement à l' $\alpha$ -tocophérol (>1,2mg/100g). En effet, l'analyse des tocophérols indique des teneurs élevées en  $\alpha$ -tocophérol (entre 1,2 et 6mg/100g). Néanmoins, des différences significatives sont souvent notées entre les échantillons d'huiles. Les huiles provenant de la région Tlemcen (fellaoucen, nédroma, maghnia, ghazaouet), Mostaganem (sidi ali), Ain-Temouchent (bnisaf), Tizi-Ouzou, renferment les teneurs les plus élevées en  $\alpha$ -tocophérol avec 3,65mg/100g, suivie avec les régions de Tlemcen (Sabra, beni Snous), Bejaia (sadouk) avec un taux de 1,36mg/100g. Par ailleurs, les régions de Mostaganem (Aintadles), Mascara (Mohammedia) se distinguent par une faible quantité de 0,34 et 0,20mg/100g respectivement. En moyenne, la quantité présente en  $\alpha$ -tocophérol dans l'huile d'olive est de 1 à 5mg/100g.



**Figure 23 :** Teneur des tocophérols dans l’huile d’olive selon les différentes régions

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Gutierrez et al [67], qui ont trouvé des quantités importantes en l’ $\alpha$ -tocophérol dans l’huile d’olive qui varient entre 1,2 et 40mg/100g. Ces substances exercent le pouvoir et l'action antioxydant et viennent essentiellement de la graine de fruit [68-69]. Selon Alasalvar et al [70], la proportion des tocophérols est fonction de plusieurs facteurs tels que la nature de l’huile, l’origine géographique, la méthode d’extraction, la culture et le climat. Bien que les données scientifiques sur ce point soient relativement minces, il semble que la variété de l’olive et sa maturité ainsi que les conditions et la durée de la conservation jouent un rôle capital [71]. Aparicio et Luna[72] , ont estimé que la source majeure de variation des tocophérols est d’une part la variété dans 79% des cas et d’autre part l’interaction entre la variété et le stade de maturité dans 35%.



# **CONCLUSION**

La substance que l'on nomme dans le langage courant « vitamine E » est en réalité un terme générique qui englobe un grand nombre de molécules de structure chimique proche mais différente. Elles sont classées en 2 catégories majeures : les tocophérols et les tocotriénols. Ces substances font partie des antioxydants.

La vitamine E existe sous forme synthétique et sous forme naturelle surtout dans les produits d'origine végétale.

Son dosage relève d'un procédé complexe. La technique la plus fréquemment utilisée à l'heure actuelle est la chromatographie liquide de haute performance couplée à un détecteur électrochimique, ultraviolet ou de fluorescence.

Le but de ce mémoire est d'étudier la teneur de cette substance dans quelque échantillons d'huile d'olive algérienne sous le thème «**Détermination des antioxydants des huiles d'olive (N.W Algérie)** ». C'est un sujet de mémoire de Magister, Post-Graduation en Spectrochimie et Méthodes d'Analyse. Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire de Recherche en Spectrochimie et Pharmacologie Structurale de l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

L'objectif principal de ce travail était une étude analytique, qui nous a permis de déterminer la concentration du l' $\alpha$ -tocophérol des huiles d'olive algériennes d'origines différentes au moyen de la chromatographie liquide à haute performance (RP-HPLC).

La détermination de l' $\alpha$ -tocophérol dans l'huile d'olive semble être difficile en raison de la complexité de la matrice utilisée. L'extraction de cet élément par le solvant CH<sub>3</sub>OH proposé par Michael Murkovic et Sonja Lechner a répondu à notre but. La quantification est réalisée par étalonnage externe et la compensation des erreurs a été largement vérifiée tout au long de cette étude.

Les premiers résultats de l'étude indiquent que la composition en  $\alpha$ -tocophérol des huiles d'olive de différentes régions d'Algérie est assez variable.

Les huiles provenant des régions Tlemcen (fellaoucen, nédroma, maghnia, ghazaouet), Mostaganem (sidi ali), Ain-Temouchent (beniSaf), Tizi-Ouzou, renferment les teneurs les plus élevées en  $\alpha$ -tocophérol avec 3,65mg/100g, suivie avec les régions de Tlemcen (Sabra, benisnous), Bejaia (sadouk) avec un taux de 1,36mg/100g.

D'après l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que la proportion de  $\alpha$ -tocophérol est fonction de plusieurs facteurs tels que la nature de l'huile, l'origine géographique, la méthode d'extraction, la culture et le climat.

Ce travail nous ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de l'analyse par chromatographie. Ces perspectives sont les suivantes :

- ✚ la caractérisation encore plus fine des huiles d'olive de différentes origines en employant d'autres méthodes spectroscopiques, comme le moyen et le proche infra rouge, et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN);
- ✚ l'étude de l'évolution de la qualité des huiles d'olive au cours du chauffage par l'emploi de différentes méthodes analytiques et spectroscopiques, dans le but d'étudier leur effet sur la prévention sanitaire ;

**Références**

**Bibliographiques**

- 1- Uzzan.A, «Olive et huile d'olive». In «Manuel des corps gras» Karleskind. A, Tome 1, Ed : Lavoisier, Paris, **(1992)** 221-228.
- 2-Conseil Oléicole International Encyclopédie Mondiale de l'Olivier. **(1997)** Plaza and James Editors S. A.
- 3-Conseil Oléicole International (2009a) Production mondiale d'huile d'olive, Novembre 2009.
- 4-Conseil Oléicole International (2009b) Consommation mondiale d'huile d'olive, Novembre 2009.
- 5-Keys.A, (Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart diseases. Cambridge, Massachusetts, USA, **(1980)** Harvard University Press.
- 6-Viola.P , Olive oil and health, International Olive Oil Council, (1987)Madrid, Spain.
- 7-Boskou.D , (Ed.) Olive oil: chemistry and technology (1st edition). Champaign Illinois: American oil chemists society. USA. **(1996)** 268 pages.
- 8-Harwood J. L. & Aparicio R. (Eds.) Handbook of olive oil : analysis and properties. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publications, **(2000)**.Inc. 620 pages
- 9-Conseil Oléicole International, Trade standard applying to olive oil and olive-pomace oil. International Olive Oil Council, **(1996)** COT / T.15 n°2, Madrid, Spain.
- 10-Camps. G, et Faber. H , «L'olivier et huile dans l'agriculture romaine» Ed: (1953) imprimerie officielle, Alger.
- 11-Harwood.L, Aparicio R. (Eds.) Handbook of olive oil : analysis and properties.Gaithersburg, Maryland, USA: *Aspen publications, Inc.* **(2000)**:620 pages.
- 12-Brenes.M , A. Garcia , J. J. Rios , P. Garcia and A. Garrido Use of 1- acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. The International Journal of Food Science and Technology. **(2002)** 37 (6) : 615-625.

- 13-Visioli.F and Galli.C, The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Reviews*.(1998) 56(5):142-147.
- 14-Brenes.M , Hidalgo.F.J ,A. Garcia ,Rios.J.J ,Garcia.P ,Zamora.R, A. Garrido Pinoresinol and 1 acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American oil Chemist's Society*. (2000)77 (7):715-720.
- 15-Binchi Bianchi.G, Pozzi.N, 3,4-dihydroxyphenylglycol, a major C6-C2 phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochemistry* (1994) 35:1335-1337.
- 16- D. Guedon, B. Le Tutour, Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* (1992) 31:1173-1178.
- 17-Montedoro.G, Servili.M, Baldioli.M, Miniati.E, Simple and Hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semi quantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* (1992) 40:1571-1576.
- 18-Dimitrios.B,sources of natural phenolic antioxidants , *Trends in Food Science & Technology* (2006)17:505–512
- 19-Sherwin.E.R , Antioxidants for vegetable oils. *Journal of the American Chemical Society*. (1976) 53: 430-436.
- 20-Psomiadou.E,Tsimidou.M, Boskou.D,  $\alpha$ -tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2000)48(5):1770-1775.
- 21-Gille.L, Rosenau.T, Koslov.A.V, and Gregor.W, Ubiquinone and tocopherol: Dissimilar siblings. *Biochemical Pharmacology*. (2008)76(3):289-302.
- 22-Gould, W.A. Total quality management for the food industries. Baltimore. (1992) USA: CTI Publications Inc.
- 23-Conseil Oléicole International (COI), Activités de coopération Technique. (1990) Olivea 38.
- 24-Commission of the European Communities, Regulation No. 2568/91 of 11 July and later modifications on the characteristics of Olive Oil and Olive-residue Oil and on the relevant Methods of Analysis. Official Journal of the European Communities, (1991) No L248, 1-82.
- 25-Blekas, Psomiadou.G, Tsimidou.G.E, et Boskou.D, On the importance of total polar phenols to monitor the stability of greek virgin olive oil. *European Journal of lipid Science and technology*, (2002) 104(6): 340-346.
- 26-Psomiadou, Konstantinos.E, Blekas.X, Tsimidou.K.G et Boskou, D. Proposed parameters for monitoring quality of virgin olive oil (koroneiki cv). *European Journal of lipid Science and technology*, (2003) 105(8): 403-409.
- 27-Codex Alimentarius. Norme Révisée pour les Huiles d'Olive, (1993) CL 1993/15-FO.

- 28-Conseil Oléicole International (COI), Activités de coopération Technique. (1990) Olivea 38.
- 29-Venkateshwarlu, Let.G, Meyer.M.B, A.S. et Jacobsen, C. Modeling the sensory impact of defined combinations of volatile lipid oxidation products on fishy and metallic off flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2004) 51(22): 6564-6571.
- 30-Ouaini, N. Medawar, S. Daoud, R. Ouaini, R. Chebib, H. Rutledge, D. et Estephan, N. Etat actuel des huileries d'olive au Liban. Potentiel de production. *New Medit*, (2005) N4 : 31-35.
- 31-Underland, I. Stading, M. et Lingnert, H. Influence of skinning on lipid oxidation in different horizontal layers of herring (*Clupea harengus*) during frozen storage., *J.Sci Food Agric*, (1998) 78: 441-450.
- 32-Pérez, A.G. Luaces, P. Ríos, J.J. Garcia, J.M. et Sanz, C. Modification of volatile compound profile of virgin olive oil due to hot-water treatment of olive fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2003) 51: 6544-6549.
- 33-Di Giovacchino, L. Technological Aspects. In : *Handbook of olive oil : Analysis and properties* . Harwood, J. et Aparicio, R. Edition : An Aspen Publication, (2000) USA, 17-59.
- 34-Cossut, J. Defrenne, B. Desmedt, C. Ferroul, S. Garnet, S. Humbert, S. Roelstraete, L. Vanexeem, M. et Vidal, D. Les corps gras : Entre Tradition et Modernité. *Projet en Gestion de la qualité Nutritionnelle et Marketing des produits alimentaires*. (2002) 139p.
- 35-Kalua, C.M. Allen, M.S. Bedgood Jr, D.R. Bishop, A.G. Prenzler, P.D. et Robards, K. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality : A critical review. *Food Chemistry*, (2007) 100: 273-286.
- 36-Claude Bourgeois. Les vitamines dans les industries agroalimentaires. (2003), Editions TEC & DOC, pages 11, 74, 86 - 90, 274 - 277, 636 - 656.
- 37-Surai, P.F. Vitamin E. In : Surai P.F., *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press: Nottingham, (2002), 27-128
- 38-Cuvelier C., Dotreppe O., Istasse L.,. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E *Ann. Méd. Vét.* (2003)147, 315-324.
- 39-J.S.Bonvehí, F.V.Coll, I.A Rius. Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations, and biscuits. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, (2000), **83**, 627-634
- 40-Cuvelier C ; O . Dotreppe et L.Istasse Chimie ,Sources alimentaires et dosage de la vitamine E ,*Méd. Vét* ; (2003)147 : 315-324.
- 41-Fournet et Mounz A.V..Natural Products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs.*Current Topics in Medicinal chemistry*, (2002), 2:1213-1235.

- 42-R .Laouer, Développement de la méthode RP-HPLC pour le dosage de la vitamine E plasmatique des enfants d'âge préscolaire de la wilaya de Tlemcen, , CHU Tlemcen. Thèse de magister, U.Tlemcen.
- 43-Liu L.-B .,Hashi Y.,Qin Y.-P.,Zhou H.-X.,Lin J.-M.,*J.Chrom.B*, (2007) ,845,61-68.
- 44-Zambonin C.G.,Quinto M., Vietro N. D.,Palmisano F., *Food Chem.*,86 (2004) ,269-274.
- 45-F.E. Ahmed,*Trends in Anal.Chem.*, (2001) ,20 649-661.
- 46-Namies'nik J.,Gorecki T.,*Polish J. of Environ. Studie* [4] Kok M., Yong F., Lim G.,
- 47-*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1987),35, 779-781.
- 48- Macku C., Jennnings W., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 845-848, 1987.
- 49-Miszczak A., Forney C., Prange R., *Journal of American Society for Horticultural Science*, 120, 650-655, 1995. s, 10 (2001) ,77-84.
- 50- Ferreira V., Fernandez P. Melendez J., Cacho J., *Journal of Chromatography A*, (1995), 695, 41-55,.
- 51-Kok M.F., Yong F.M., Lian G., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1987), 35, 779- 781,.
- 52- Macleod J.L., De Troconi G., *Phytochemistry*, (1982),21, 2523-2526,.
- 53-S.L .Abidi. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J.Chromatogr. A*, (2000), **881**, 197-216.
- 54-C.Cuvelier, O.Dotreppe, L.Istasse. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E *Ann. Méd. Vét.*, (2003), **147**, 315-324.
- 55-Rosset R., Cande M., Jardy A., *Chromatographie en phase liquide et supercritique*, Masson, Paris, (1991).
- 56-B. Tan, L.Brzuskiwicz. Separation of tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, (1989), **180**, 368-373.
- 57-Belajová E., Suhaj M., *Food Chemistry*, (2004),86, 339-343,.
- 58-Shui G., Leong L.P., *Journal of Chromatography A*,(2002), 977, 89-96.
- 55-Chiaramonti N., thèse de Troisième Cycle, Université de Corse, (1996).
- 59- Justesen U., Knuthsen P., Torben L., *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110,1998.
- 60- Escarpa A., Gonzalez M.C., *Journal of Chromatography A*, (1998),823, 331-337.
- 61- Careri M., Elveri L., Mangia A., Musci M., *Journal of Chromatography A*, 881, 449- 460.
- 53-Abidi S.L, Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J.Chromatogr. A*, (2000), **881**, 197-216.
- 55-Rosset R, Caude M, Jardy A, *Chromatographie en phase liquide et supercritique*, Masson 1991 Paris.



- 62-Djellouli O. Recherche de la carence en vitamine A par Dosage du rétinol plasmatique par RP-HPLC chez les enfants de 12 à 59 mois dans la wilaya de Tlemcen, CHU Tlemcen. Thèse de magister, U.Tlemcen 2006, **5**,36-41.
- 63-Murkovic M, Lechner S, Pietzka , M.Bratacos, Katzogiannos M E , Analysis of minor component in olive oil,61,2004,155-160.
- 65- Nicoletti G, Crescibene L, Scornaienchi M, Bastone L, Bagala A, Napoli I D, Caracciolo M, Quattrone A . Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **33** (2001) 7–12.
- 66-Ruperez F J, Martin D, Herrera E, Barbas C. Chromatographic analysis of  $\alpha$ -tocopherol and related compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A*, 2001, **935**, 45-69.
- 67-José L. Quiles, M. Carmen Ramírez-Tortosa and Parveen Yaqoob, olive oil and health,(2006) ,978-1-84593-068.
- 68-Psomiadou, E. et Tsimidou M. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids and chlorophylls, for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: (1998) 5132-5138.
- 69-Alasalvar, Shahidi C, Ohshima F, Wanasundara T, Yurttas U, Liyanapathirana H C, C.M. et Rodrigues, F.B. Turkish Tombul Hazelnut. 2. Lipid characteristics and oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: (2003) 3797-3805.
- 70-Ranalli A. et Angerosa F. Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products(1996).
- 71-Psomiadou, E. Tsimidou, M. et Boskou, D. Alpha-tocopherol content of Greek virgin olive oil. *J Agric. Food Chem*, 48: (2000) 1770-1775.
- 72-Aparicio, R. et Luna, G. Characterization of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: (2002) 614-627.

## ملخص

تمت معايرة الفيتامين (E) في عينات من زيت الزيتون تم جمعها من وحدات استخلاص تقع في مناطق إنتاج زيت الزيتون باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة تحت الضغط العالي بمجس فوق البنفسجي، تتميز هذه الطريقة بالحقن المباشر للسائل الطافي المتحصل عليه بعد معالجة 500مغ من زيت الزيتون مع 500مل  $\text{CH}_3\text{OH}$ . تعيين التراكيز تم بواسطة الفيتامين (هـ) و الذي استعمل كمعيار خارجي. عملية الفصل تمت بواسطة المزيج ثابت التركيب  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$  (70: 30%).  
**الكلمات المفتاحية:** الفيتامين (هـ)، الكروماتوغرافيا، زيت الزيتون، كمية.

## Résumé

Le dosage de la vitamine E des échantillons d'huile d'olive collectés à partir d'unités d'extraction localisées dans plusieurs régions oléicoles est réalisé par la méthode chromatographie liquide à haute performance à phase inverse, avec détection UV. Cette méthode est caractérisée par l'injection directe du surnageant obtenu par traitement d'une masse de 500mg d'huile d'olive avec le solvant  $\text{CH}_3\text{OH}$  (500ml). La quantification des concentrations est réalisée en utilisant l' $\alpha$ -tocophérol comme étalon externe, l'éluion est faite en mode gradient en utilisant le mélange  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$  (70 : 30%) et à débit 1.5mL/mn.

**Mots clefs :** vitamine E, chromatographie, huile d'olive, teneur.

## Abstract

The determination of vitamin E in olive oil samples collected from extraction units located in several oil-producing regions is performed by the method of high performance liquid chromatography in reverse phase with UV detection. This method is characterized by direct injection of the supernatant obtained by treating a 500mg of olive oil with the solvent  $\text{CH}_3\text{OH}$  (500ml). Quantification of concentrations is performed using the  $\alpha$ -tocopherol as external standard, the elution gradient mode is made using the  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$  mixture (70: 30%) and flow 1.5mL/mn.

**Keywords:** vitamin E, chromatography, olive oil, content.