



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEM

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Laboratoire de Spectrochimie et Pharmacologie Structurale

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Moléculaire

Par :

M^{elle} Berkani Manal

Sur le thème

Séparation de vitamers lipophiles dans quelques huiles végétales par chromatographie HPLC

Soutenu publiquement le 27/06/2018 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Djellouli Omar	MAA	Centre universitaire de Naama	Encadreur
Mr Dahmani Benamar	Professeur	Université de Tlemcen	Co-Encadreur
Mr Larabi Lahcène	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr Harek Yahia	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur

Année Universitaire 2017/2018

Dédicace

A mes très chers parents

A mes frères et à mes sœurs

A mes oncles et à mes tantes

A mes enseignants

A mon fiancé

A mes collègues des laboratoires

A mes amies

A tous ceux qui me sont chers

Remerciement

Ce travail a été effectué dans le 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 aussi à remercier mon encadreur Mr **Djellouli Omar**, Maitre assistant classe A au centre universitaire de Naama pour sa patience et son dévouement pour la réalisation des expériences ainsi que l'attention qu'elle a accordé pour l'enrichissement de ce travail et l'explication rationnelle et scientifique des résultats d'expériences menées. Encore une fois merci.

Je suis vivement reconnaissant aux membres du jury : Mr. **Dahmani Benamar** professeur à l'Université de Tlemcen mon Co-encadreur. Monsieur **Larabi Lahcène** professeur à l'université de Tlemcen. Monsieur **Harek Yahya** professeur à l'Université de Tlemcen ; qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les examinateurs de ce travail.

Je tiens à remercier tous mes collègues qui m'ont aidé de loin ou de près dans la réalisation de ce travail. J'exprime également tous mes remerciements à l'ensemble des membres de l'équipe de chimie moléculaire du laboratoire de Spectrochimie et Pharmacologie Structurale.

Berkani Manal

TABLE DES MATIERES

Table des matières-----	I
Liste des figures -----	IV
Liste des Tableaux -----	VI
Introduction générale -----	2
I.1 Généralité sur L'huile d'olive -----	5
I.2 Composition chimique de l'huile d'olive -----	8
I.3 Composition d'huile d'olive -----	9
I.3.1 Acides gras et triacylglycérols-----	9
I.3.2 Mono- et diacylglycérols-----	10
I.4 Autres constituants -----	11
I.4.1 Composés de vitamine E (tocophérols et tocotriénols)-----	11
I.4.2 Hydrocarbures -----	12
I.4.3 Pigments-----	12
I.4.4 Stérols-----	13
I.4.5 Dialcols triterpéniques-----	14
I.4.6 Alcools gras, cires-----	14
I.4.7 Composés volatils et aromatiques-----	15
I.4.8 Phospholipides-----	20
I.4.9 Les Métaux-----	20
I.5 Effet du traitement des huiles sur la composition d'huile d'olive-----	20
I.5.1 Composés aromatiques -----	20
I.5.2 Polyphénols -----	21
I.5.3 Autres constituants mineurs -----	22
I.6 Les composés vitamines -----	22

I.6.1 Biochimie de la vitamine E -----	22
I.6.1.1 Propriété antioxydante de vitamine E -----	22
I.6.1.2 Rôle biologique de la vitamine E -----	23
I.6.2 Chimie de la vitamine E-----	23
I.6.2.1 Définition IUPAC de la vitamine E -----	23
I.6.2.2 Structures chimiques et nomenclature-----	24
I.6.2.3 Propriétés physicochimiques de vitamine E-----	25
I.6.2.4 Les propriétés spectroscopiques de la vitamine E -----	26
I.6.2.4.1 Transitions électroniques -----	27
I.6.2.4.2 Mesure de l'absorbance -----	27
II.1 La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) -----	30
II.1.1 Principe-----	30
II.1.2 Le mode de chromatographie-----	30
II.1.3 La phase stationnaire -----	31
II.1.4 La phase mobile -----	31
II.1.5 Détection -----	31
II.1.6 Description du système HPLC utilisé -----	32
II.2 Traitement de l'échantillon-----	34
II.2.1 Les procédés d'obtention-----	34
II.2.2 L'extraction liquide –liquide (ELL) -----	34
II.3 Analyse quantitative par chromatographie liquide à haute performance-----	34
II.3.1 Aires des pics et logiciels de chromatographie-----	35
II.3.2 Méthode d'étalonnage interne -----	35
II.3.3 Méthode d'étalonnage externe -----	36
III.1.1 Matériels et méthode-----	40
III.1.2 Matériels-----	40
III.1.3 Méthode -----	40

III.1.4 Traitement des échantillons d'huile d'olive	41
III.2 Résultats et discussion	41
III.2.1 Analyse qualitative	41
III.2.1.1 Choix de la phase stationnaire	41
III.2.2 Choix du solvant d'extraction	44
III.3 Identification de l'alpha-tocophérol	45
III.4 Analyse quantitative	46
III.4.1 Plan d'étalonnage externe	46
III.4.2 Préparation des solutions étalons pour tracer la droite d'étalonnage	47
III.4.3 Linéarité	49
III.5 Dosages des échantillons d'huile d'olive	49
III.5.1 Nature des échantillons	49
III.5.1.1 Distribution des aires des pics de l'alpha-tocophérol	51
III.5.1.2 Evaluation des teneurs en vitamine E des échantillons analysée	51
Conclusion	54
Références Bibliographiques	56

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1 : Huile d'olive commercialisée -----	7
Figure I. 2 : Structures des caroténoïdes dans l'huile d'olive-----	13
Figure I. 3 : β -sitostérol principale des méthylstérols de l'huile d'olive -----	14
Figure I. 4 : Des acides pentacycliques hydroxyterpéniques ont également été signalés dans l'huile d'olive -----	15
Figure I. 5 : Structures des principaux composés phénoliques signalés dans l'huile d'olive : le tyrosol, hydroxytyrosol et dérivés -----	18
Figure I. 6 : Structures des principaux composés phénoliques rapportés dans l'huile d'olive : flavonoïdes -----	19
Figure I. 7 : Structures des principaux composés phénoliques signalés dans l'huile d'olive: lignanes -----	19
Figure I. 8 : Composés non phénoliques étroitement apparentés extraits avec des phénols --	20
Figure I. 9 : Schéma d'une onde électromagnétique -----	26
Figure I. 10 : Principe de mesure de l'atténuation du rayonnement -----	28
Figure II. 1 : Analyse de tocophérols par chromatographie liquide à haute performance. 1 correspond à δ -tocophérol, 2 à γ -tocophérol, 3 à α -tocophérol, 4 à β -tocophérol -----	30
Figure II. 2 : Système HPLC du Laboratoire de Recherche « Spectrochimie et Pharmacologie Structurale »-----	32
Figure II. 3 : Les positions d'une vanne à six voies-----	33
Figure. III. 1 : comparaison des chromatogrammes sur phase stationnaires C8 (haut) et C18 (bas), obtenus après injection des échantillons traités par les solvants : a) Méthanol, b) Propanol, c) Acétonitrile, d) Ether de pétrole, e) Acétate d'éthyle, f) Ethanol, g) Butanol--	43
Figure III. 2 : Comparaison de l'efficacité de sept solvants, pour extraire six vitamines de la vitamine E-----	45
Figure III.3 : Comparaison de chromatogrammes : une solution étalon d' α -tocophérol (haut) et une solution d'huile d'olive (bas). Pics identifiés, 1 à 5 : composés vitamines probables de la vitamine E, 6 : α -tocophérol (tr = 4.67 min)-----	46
Figure III. 4 : Spectre d'absorption UV caractéristique de α -tocophérol-----	47
Figure III. 5 : Comparaison des chromatogrammes des différentes solutions étalon de l' α -tocophérol-----	48

Figure III. 6 : Droite d'étalonnage externe. Equation de la droite ($y = 6377.987 x + 11310.3$) $r = 0.9999, r^2 = 0.9998$ -----	49
Figure III. 7 : Les différentes régions de prélèvement-----	50
Figure III.8 : Distribution des aires des pics de l' α -tocophérol-----	51
Figure III. 9 : Teneur des tocophérols dans l'huile d'olive selon les différentes régions -----	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. 1 : Composition en acides gras de l'huile d'olive -----	9
Tableau I. 2 : Composition en acides gras (% en poids d'esters méthyliques) des huiles d'olive grecques-----	10
Tableau I. 3 : Noms chimique de tocophérols et tocotriénols -----	23
Tableau I. 4 : La dénomination des tocotriénols (T3) en fonction de leurs substituants est la suivante -----	24
Tableau I. 5 : Structure et dénomination des quatre tocophérols-----	25
Tableau I. 6 : Les propriétés physicochimiques des composés de la vitamine E-----	25
Tableau III.1 : Données quantitatives sur l'efficacité de l'extraction de différents solvants-----	44
Tableau III.2 : Résultats de l'analyse UV et HPLC des solutions étalons de l' α -tocophérol-----	48
Tableau III. 3 : Résultats de l'analyse RP- HPLC des échantillons-----	50

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

L'huile d'olive est une composante majeure de l'alimentation des pays environnants la mer méditerranée. L'huile d'olive joue un rôle positif dans la prévention de certaines maladies, en plus de renforcer le système immunitaire et d'aider à protéger contre les virus.

L'huile d'olive a également été jugée efficace dans la lutte contre les maladies telles que : le cancer, les maladies cardiaques et le stress oxydatif.

L'huile d'olive est un mélange de triacylglycérols, avec quelques acides gras libres. Il contient des composés non liés chimiquement aux acides gras, tels que : les alcools aliphatiques, stérols libres, tocophérols, chlorophylles et caroténoïdes.

Plusieurs paramètres influencent la composition d'huile tel que, la variété et le degré de maturité des fruits, les méthodes d'extraction et enfin les conditions climatiques et agronomiques.

Parmi les principaux composés mineurs il y a la vitamine E. Les tocophérols et le tocotriénols sont deux formes de vitamine E, chacune de ces formes peut être subdivisée en composés α , β , δ et γ . La teneur en tocophérol varie de 52% à 87% d' α -tocophérol suivi de 15-20% de β -tocophérol et 7-23% de γ -tocophérol. L' α -tocophérol est connu être l'antioxydant lipophile le plus puissant, et qui pourrait jouer donc un rôle clé en inhibant les oxydations biochimiques.

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 travail est de caractériser la teneur en α -tocophérol dans les huiles d'olives de différentes régions Algériennes. Le thème de cette étude est « **Séparation de vitamers lipophiles dans quelques huiles végétales par chromatographie HPLC** ». Ce projet est réalisé au laboratoire de recherche en Spectrochimie et Pharmacologie structurale de l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen de la faculté des sciences.

La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse RP-HPLC est la méthode analytique la plus utilisée pour l'identification et la quantification des composés inconnus de la vitamine E. La quantification de l' α -tocophérol est réalisée par étalonnage externe.

La méthode chromatographique appliquée est caractérisée par l'injection directe du surnageant obtenu après traitement de l'échantillon.

Cette étude est répartie en trois chapitres :

- Le premier concerne la bibliographie, nous traitons la composition chimique des huiles d'olives, la biochimie, la biosynthèse et les propriétés de la vitamine E.
- Dans le deuxième chapitre, nous expliquons l'analyse de la vitamine E par chromatographie liquide à haute performance.
- Le troisième chapitre, présente le dosage des échantillons d'huile d'olive par RP-HPLC
- Finalement nous terminons avec une conclusion et des perspectives de notre recherche.

CHAPITRE I : Bibliographie

I.1 GENERALITE SUR L'HUILE D'OLIVE

L'huile d'olive fait partie intégrante du régime alimentaire méditerranéen, sa consommation remonte aux temps bibliques, et la culture de l'olivier ainsi que la production d'huile d'olive des olives mures constituent une composante essentielle des pratiques agricoles dans Bassin méditerranéen [1]. L'oléiculture répandue dans toute la région méditerranéenne s'avère être importante pour l'économie rurale, le patrimoine local ainsi que pour l'environnement [2, 3]. L'huile d'olive vierge, obtenue à partir du fruit *Olea europaea* L est la seule huile comestible produite à grande échelle dans le monde entier par des méthodes mécaniques ou physiques. Sa consommation a été vue en augmentation au cours des dernières années en raison de ses caractéristiques sensorielles uniques, en plus de la nutrition et propriétés thérapeutiques rapportées [3].

En fait, l'huile d'olive est un produit très polyvalent, longuement connu par de nombreuses générations dans les zones méditerranéennes comme essentielles à la santé de la population. Cependant, à l'heure actuelle, son utilisation n'est plus limitée aux pays méditerranéens, elle est largement appréciée dans le monde entier pour ses propriétés nutritionnelles et de santé. L'huile d'olive vierge possède des attributs sensoriels uniques, se caractérisant par une saveur, qui représente l'un de ses aspects qualitatifs les plus importants, en jouant un rôle majeur sans approbation du consommateur [2]. L'association de la nourriture avec la santé est universelle et bien brevetée. Dans les dernières décennies, l'importance de la nutrition dans l'esprit du public a augmenté et cette tendance est toujours maintenue.

Des enquêtes montrent que la protection/prévention contre la maladie, la lutte contre l'obésité et la qualité nutritionnelle des aliments est d'autant plus prioritaire que l'amélioration du goût, de la couleur et de la texture des aliments [4]. Au fil des années, le soi-disant régime alimentaire est devenu largement associé à l'amélioration de la santé et du bien-être ainsi que de la protection contre les maladies cardio-vasculaires, les cancers du côlon, du sein et de la peau [5]. Le régime alimentaire méditerranéen comprend une consommation importante de fruits et légumes complétés avec un apport élevé d'huile d'olive et d'autres des produits. L'huile d'olive est un produit de grande importance en raison de sa valeur nutritionnelle, qui a été reconnu internationalement [6]. Par conséquent, l'huile d'olive est une partie essentielle de l'alimentation des gens, en raison de sa saveur et valeur culinaire ainsi que ses propriétés nutritionnelles et biologiques et ses effets sur la santé humaine [7]. L'huile d'olive vierge est

l'une des graisses comestibles les plus prisées dans les zones méditerranéennes car il peut être consommé sans aucun processus de raffinage, du fait qu'il est obtenu à partir d'olives exclusivement par des procédés mécaniques et conserve ainsi son arôme naturel. Il a également des caractéristiques nutritionnelles très appréciées [8]. En outre, l'huile d'olive semble être un aliment fonctionnel avec divers bio-composants. Parmi ceux-ci il y a les acides gras mono-insaturés qui peuvent avoir des avantages spéciaux pour la santé ainsi que des composés phytochimiques [9].

Certains de ces effets sont associés à la teneur en huile d'olive extra vierge, en composés phénoliques de grandes quantités d'acide oléique, de tocophérols et de phyto-stérols [10]. Les expériences ont montré que l'huile d'olive est une source d'au moins 30 composés phénoliques, qui sont de puissants antioxydants, *in vitro* et *in vivo*, en plus de posséder d'autres activités biologiques importantes. En fait, ils ont été suggérés de jouer un rôle préventif dans le développement du cancer et des maladies cardiaques [11].

En outre, en dehors de l'activité antioxydante, les composés phénoliques de l'huile d'olive ont d'autres rôles, notamment liés aux propriétés nutritionnelles et à la qualité sensorielle [12]. Les effets bénéfiques sont attribués à un profil d'acides gras favorables et à la présence de quelques composants mineurs qui sont également responsables de la saveur et du goût uniques de l'huile d'olive [5]. L'accumulation de preuves suggère que l'huile d'olive peut avoir plusieurs avantages pour la santé, d'inclure un risque réduit de maladie coronarienne, la prévention de plusieurs variétés de cancers et la modification des réponses immunitaires et inflammatoires [9].

En plus, l'huile d'olive contient des composés ayant des activités puissantes contre les bactéries, les champignons et mycoplasmes [5]. L'aspect fondamental qui distingue l'huile d'olive des autres huiles végétales est sa haute proportion d'acides gras mono-insaturés, tels que l'acide oléique qui représente environ deux tiers de la teneur totale en acides gras, ainsi que la présence modeste d'acides gras polyinsaturés [7]. Une alimentation saine doit contenir une quantité limitée d'acides gras saturés afin de réduire la teneur totale en cholestérol et une grande quantité d'acides gras mono-insaturés qui empêchent le risque de maladies cardiovasculaires, de réduire les besoins

en insuline et de diminuer concentration plasmatique de glucose.

L'huile d'olive contient des antioxydants naturels tels que les tocophérols, les caroténoïdes, les stérols et les composés phénoliques qui représentent 27% de la fraction insaponifiable. Les principaux phénols identifiés dans l'huile d'olive sont les galliques, caféique, vanilliques, p-coumariques, syringiques, féruliques, homovanilliques, les acides p-hydroxybenzoïque et protocateuriques, les tyrosols et l'hydroxytyrosols. Les composés phénoliques de l'huile d'olive ont des effets multiples, y compris la stabilité de l'huile d'olive extra vierge pendant le stockage. Il a été affirmé que l'hydroxytyrosol est l'antioxydant le composé le plus actif dans l'huile d'olive vierge. De plus, les composés phénoliques ont la capacité d'inhiber ou de retarder le taux de croissance de plusieurs bactéries et micromycètes [7]. La matière insaponifiable dans l'huile d'olive constitue environ 1 à 2%, étant la majeure partie représentée par des phytostérols, qui sont reconnus par leurs effets biologiques, tels que l'activité cytostatique, le contrôle du cholestérol sanguin ou la prévention du cancer [10]. La (Food and Drug Administration des États-Unis) a autorisé une revendication sur les étiquettes d'huile d'olive indiquant : "Des preuves scientifiques limitées et non concluantes suggèrent que manger environ deux cuillères à soupe (23g) d'huile d'olive par jour peut réduire le risque de maladie coronarienne " [13].



Figure I. 1 : Photo d'une huile d'olive commercialisée.

I.2 COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE D'OLIVE

La composition chimique de l'huile d'olive vierge est influencée par des facteurs génétiques associés à des facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques. De cette façon, les caractéristiques de l'huile d'olive sont grandement influencées par la région de production [14]. En dehors de ces facteurs, la qualité de l'huile d'olive est également fortement liée aux conditions physiologiques du fruit à partir de laquelle il a été extrait, de sorte que le stade de maturation peut affecter directement ou indirectement la qualité.

De plus, il existe un effet indirect apporté par l'action d'agents externes de détérioration, qui augmentent pendant la maturation des fruits [16]. Parce que la maturation avance certains processus métaboliques ont lieu, qui implique des changements dans le profil de certains composés tels que les triglycérides, les acides gras, polyphénols, tocophérols, chlorophylles et caroténoïdes. Ces changements, affectent la stabilité et la valeur nutritive du produit final. Gomez-Rico et *al* [17] ont étudié les influences des pratiques agronomiques et ont constaté que l'irrigation a positivement affecté la qualité des fruits et de l'huile d'olive. D'autre part, Mendoza et *al* [15]. Ont étudié 88 échantillons d'huile d'olive vierge originaire d'Espagne, de trois récoltes successives, produites à partir du mélange de deux variétés d'olives : Morisca et Carrasqueña. Les résultats ont montré que 88,5% des cas groupés originaux sélectionnés sont correctement classés selon le stade d'affinage (85,7% vert, 80% tacheté et 78,9% mûr). Ceci a été basé sur les variables les plus discriminantes : l'avénastérol, l'acide linoléique, le bêtasitostérol et le gadoleico. Baccouri et *al* [18] ont étudié l'influence de la maturation des olives sur la qualité, les composants majeurs et mineurs et la stabilité oxydative des deux principaux cultivars tunisiens (Chétoui et Chemlali) d'huiles d'olive vierges. Leurs résultats ont indiqué une très bonne corrélation entre la stabilité à l'oxydation et les concentrations des phénols totaux, pratiquement des secoiridoids et α -tocophérol. L'huile d'olive vierge est principalement composée de triacylglycérols (entre 97 et 98%), mineurs quantités variables d'acides gras libres et de composés glycéridiques mineurs (glycérides partielles, phospholipides et triacylglycérols oxydés) et enfin environ 1% d'insaponifiables constituants variant en structure et en polarité [19]. La stabilité oxydative, la qualité sensorielle et les propriétés de santé de l'huile d'olive vierge sont possible grâce à une composition chimique équilibrée [20].

I.3 COMPOSITION D'HUILE D'OLIVE

L'huile d'olive est principalement un mélange de triacylglycérols, avec quelques acides gras libres, les mono- et diacylglycérols et les constituants non glycéridiques (0,5-1,5%). La teneur en acides gras libres varie avec le type d'huile d'olive (extra vierge, fine vierge, ordinaire, mélange de raffiné avec vierge) et est un critère de qualité important dans fixer la note.

I.3.1 ACIDES GRAS ET TRIACYLGLYCEROLS

La composition en acides gras de l'huile d'olive varie de 7,5 à 20% d'acide palmitique, 0,5-5% d'acide stéarique, 0,3-3,5% d'acide palmitoléique, 55-85% d'acide oléique, 7,5-20% l'acide linoléique et 0,0-1,5% d'acide linoléique. Myristique, heptadécanoïque et les acides eicosanoïques ne sont présents qu'à l'état de traces (Tableau I.1). Récemment, Scano *et al* [21], utilisant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ¹³C, ont détectés et quantifiés des acides cis-vaccéniques (11-18 : 1) et eicosénoïques. La composition en acides gras peut différer d'un échantillon à l'autre, selon le lieu de production, la latitude, le climat, la variété et le stade de maturité du fruit [7].

Tableau I. 1 : Composition en acides gras de l'huile d'olive.

Acide gras		Composition (%) ^a
Lauric	12:0	Non-détecté
Myristic	14:0	0.0-0.1
Palmitique	16:0	7.5-20.0
acide palmitoléique	16:1	0.3-3.5
Heptadécénoïque	17:0	0.0-0.5
Heptadécénoïque	17:1	0.0-0.6
Stéarique	18:0	0.5-5.0
l'acide oléique	18:1	55.0-83.0
Linoléique	18:2	3.5-21.0
Linolenic	18:3	0.0-1.5
Arachidique	20:0	0.0-0.8
Eicosénoïque	20:1	Non précisé
Behenic	22:0	0.0-0.2
Lignocérique	24:0	0.0-1.0

Les huiles d'olive grecques, italiennes et espagnoles sont pauvres en acides palmitiques et ont un pourcentage élevé d'acide oléique. Les huiles d'olive tunisiennes sont plus élevées dans les acides linoléique et palmitique et inférieure dans l'acide oléique. Le Tableau I. 2 présente

les valeurs de la composition en acides gras pour les huiles d'olive grecques d'après une étude d'Etat du Laboratoire chimique à Athènes. Les triacylglycérols trouvés dans des proportions significatives dans l'huile d'olive sont OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12.5-20%), POL (5.5-7%) et SOO (3-7%) (Boskou 1996). De plus petites quantités de POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO et LLL sont également rencontrés. Ces trois symboles littéraux représentent tous les triacylglycérols isomères contenant les trois groupes acyle indiqués où P = palmitique, O = oléique, S = stéarique, L = linoléique et Ln = acide linoléique.

Tableau I. 2 : Composition en acides gras (% en poids d'esters méthyliques) des huiles d'olive grecques.

Acide	Minimum	Maximum	Signifier
14:0	0.00	0.10	0.02
16:0	7.9	12.3	10.5
16:1	0.5	0.9	0.6
17:0	0.00	0.17	0.05
17:1	0.04	0.29	0.09
18:0	2.0	3.2	2.6
18:1	68.8	82.8	76.9
18:2	4.6	14.5	7.5
18:3	0.5	0.9	0.6
20:0	0.3	0.6	0.4
20:1	0.2	0.4	0.3
22:0	0.0	0.2	0.2
24:0	0.0	0.2	0.1

I.3.2 MONO- ET DIACYLGLYCEROLS

La présence de glycérides partiels dans l'huile d'olive est due soit à une biosynthèse incomplète du triacylglycérol, soit à des réactions hydrolytiques. Dans l'huile d'olive vierge, la concentration de diacylglycérols varie de 1 à 2,8% et les monoacylglycérols sont présents dans quantités beaucoup plus petites (moins de 0,25%). Les conditions de stockage affectent la distribution des acides gras. Les 1,2-diacylglycérols présents dans l'huile fraîche tendent à s'isomériser aux 1,3-diacylglycérols plus stables. L'ampleur de ce réarrangement donne des informations sur l'âge et les conditions de stockage de l'huile.

I.4 AUTRES CONSTITUANTS

Les différentes classes de constituants mineurs peuvent être divisées en deux groupes. Le premier groupe est constitué de dérivés d'acides gras tels que les mono- et diacylglycérols, phospholipides, cires et esters de stérols. Le deuxième groupe comprend des classes de composés non liés chimiquement aux acides gras : hydrocarbures, alcools aliphatiques, stérols libres, tocophérols, chlorophylles, caroténoïdes et composés polaires tels que le tyrosol et l'hydroxytyrosol. Certains constituants mineurs sont présents uniquement dans le pétrole brut. Raffinage enlève les phospholipides et les phénols ; il provoque également des impacts quantitatifs et qualitatifs significatifs changements dans les autres classes. La plupart des constituants mineurs de l'huile d'olive sont présents dans les 0,5-1,5% de matière insaponifiable.

I.4 .1 COMPOSES DE VITAMINE E (TOCOPHEROLS ET TOCOTRIENOLS)

Les tocophérols sont des vitamines liposolubles. Ils contribuent à la stabilité de l'huile. Blekas et *al* [22] et Boskou et *al* [23] ont examiné le rôle de tocophérol et sa contribution à la stabilité de l'huile d'olive triacylglycérol. Ils ont trouvé que l' α -tocophérol agit comme un antioxydant à tous les niveaux, mais l'effet antioxydant est plus élevé à faible concentration (100 mg/kg) qu'à des concentrations plus élevées (500 et 1000 mg/kg). En présence d'antioxydants plus efficaces tels que les o-diphénols, l' α -tocophérol n'a pas montré d'activité antioxydante significative pendant la période de faible accumulation de peroxyde, mais a bien agi lorsque les produits d'oxydation primaire atteint un niveau critique. La teneur en tocophérol est très variable, les concentrations peuvent aller de 5-300 mg / kg. Les valeurs habituelles pour les huiles de bonne qualité se situent entre 100 et 300 mg / kg. Des études récentes pour la détermination des tocophérols ont donné des valeurs allant de 98- 370 mg / kg dans les huiles grecques Psomiadou et *al* [24] et 36-314 mg / kg en italien huiles selon Curto et *al* [25].

Le composant principal du mélange de tocophérol est l' α -tocophérol, qui représente 95% du total. L'autre 5% du mélange est constitué de β - et γ -tocophérols. Tous les tocophérols se présentent sous la forme libre (non estérifiée).

Les huiles d'olive raffinées, blanchies et désodorisées réduisent nettement la teneur en tocophérol à cause des pertes pendant le traitement. Le tocotriénol est un constituant végétal mineur, est particulièrement abondant dans l'huile de palme et le germe de blé. Les tocotriénols ont un effet antioxydant, antihypercholesterolemie, anticancéreux. Ils peuvent servir de composant alimentaire avec de meilleurs avantages pour la santé. Les tocotriénols ont un effet inhibiteur sur l'angiogenèse.

I.4.2 HYDROCARBURES

Parmi les hydrocarbures présents dans l'huile d'olive en quantités considérables, le squalène, qui est un hydrocarbure aliphatique hautement insaturé ($C_{30}H_{50}$) avec des propriétés biologiques importantes. C'est un précurseur métabolique du cholestérol. Une riche source de squalène est l'huile de foie de requin. Squalène est également présent en petites quantités dans les tissus chez l'homme et dans certaines huiles végétales [20].

I.4.3 PIGMENTS

Caroténoïdes.

Les principaux caroténoïdes présents dans l'huile d'olive (Figure I. 2) sont le β - carotène et le lutéine. Les 5,6-époxyxanthophylles telles que la violaxanthine et la néoxanthine et leurs isomères avec un groupe 5,8-furanoïde (auroxanthin, neochrom) ont également été signalés en très petites quantités. Les caroténoïdes totaux peuvent se situer entre 1 et 20 mg / kg, mais les valeurs ne dépassent pas habituellement 10 mg / kg.

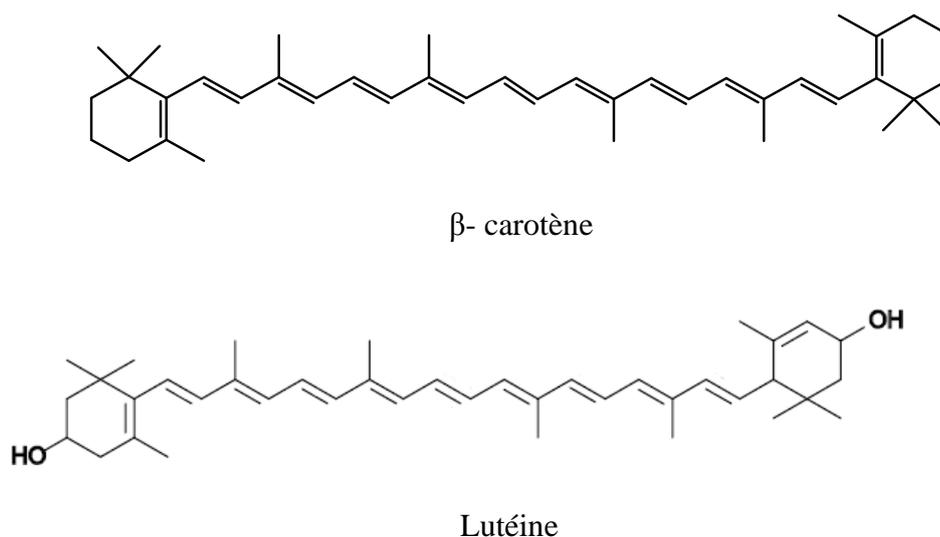


Figure I. 2 : Structures des caroténoïdes dans l'huile d'olive.

Les caroténoïdes sont des désactivateurs d'oxygène, ils protègent l'huile de la photo-oxydation. Leur rôle dans la stabilité oxydative de l'huile d'olive n'a pas encore été pleinement éludé. Il y a probablement une relation entre les caroténoïdes et le mode de l'action des phénols polaires et de l' α -tocophérol.

Chlorophylles

Les pigments de chlorophylle sont responsables des teintes verdâtres huile d'olive vierge. Leur teneur peut aller de 10 à 30 mg / kg. La chlorophylle principale présente dans l'huile tassée est la phéophytine. La chlorophylle a se produit dans l'huile juste après la production. Minguez-Mosquera et ses collaborateurs (1990) ont signalé la présence de chlorophylle a, de chlorophylle, de phéophytine et de phéophytine huiles fraîches. Psomiadou et Tsimidou (2001) n'ont trouvé aucune chlorophylle a et seulement des traces de chlorophylle b et de phéophytine b dans un certain nombre d'huiles de divers cultivars et diverses régions en Grèce. Les principaux pigments étaient la phéophytine et ses dérivés non identifiés, probablement le dérivé pyro (abstraction de la groupe carboxyméthyle) et un dérivé hydroxy formé par allomérisation. En l'absence de lumière, les chlorophylles peuvent agir comme des antioxydants faibles.

I.4.4 STEROLS

Quatre classes de stérols existent dans l'huile d'olive : les stérols courants (4- α -desméthylstérols), Les 4- α -méthylstérols, les 4,4-diméthylstérols (alcools triterpéniques) et les dialcools triterpéniques. Desméthylsterols. Ceci est la classe majeure de stérols dans l'huile d'olive à des niveaux de 100-200 mg / 100 g d'huile (figure I. 3).

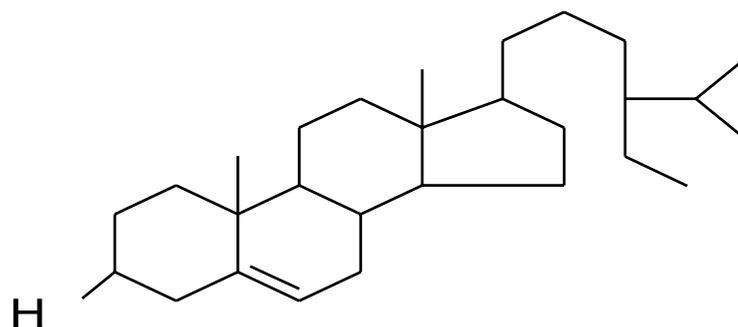


Figure I. 3 : β -sitostérol principale desméthylstérols de l'huile d'olive.

I.4.5 DIALCOLS TRITERPENIQUES

Les deux principaux dialcools triterpéniques de l'huile d'olive sont l'érythrodiol (homo-olestranol, 5 α -olean-12-ène-3 β , 28-diol) et l'uvaol (Δ -12-ursen-3 β , 28-diol). Les quantités absolues d'érythrodiol et d'uvaol vont de 1 à 20 mg / 100 g l'huile d'olive et peut atteindre 280 mg / 100 g dans l'huile de résidu β . Les dialcools triterpéniques peuvent être extraits et co-chromatographiés avec la fraction 4-desméthylstérol. Leur teneur relative dans la fraction totale déterminée par GLC est utilisée comme un indicateur fiable pour distinguer l'huile d'olive de l'huile de résidu β (Boskou 1996).

I.4.6 ALCOOLS GRAS, CIRES

Les alcools gras forment une classe importante de constituants mineurs de l'huile d'olive

parce qu'ils peuvent être utilisés pour différencier les différents types d'huile d'olive. Les principaux alcools linéaires présents dans l'huile d'olive sont le docosanol, le tetracosanol, l'hexacosanol et octacosanol. Les alcools d'atomes de carbone impairs (tricosanol, pentacosanol, heptacosanol) peuvent être présents en quantités infimes. La teneur totale en alcool aliphatique ne dépasse généralement pas 35 mg / 100 g d'huile. Dans l'huile extraite d'olive, le taux d'alcools gras est dix fois supérieur ou même plus. Les conditions climatiques sèches et les températures élevées peuvent entraîner une teneur élevée en alcool d'huile d'olive.

Les cires sont des esters d'alcools gras avec des acides gras. Le contenu d'olive en cire d'huile est très faible et n'excède pas 35 mg / 100 g. Les principales cires détectées dans l'huile d'olive sont des esters C_{36} - C_{46} mais la fraction entière est très complexe à cause de la présence de plusieurs types d'esters (saturés et insaturés, à chaîne linéaire, esters pairs) et également l'alcool benzylique, les esters de phytyle et de géranylgeranyle (Reiter et Lorbeer 2001).

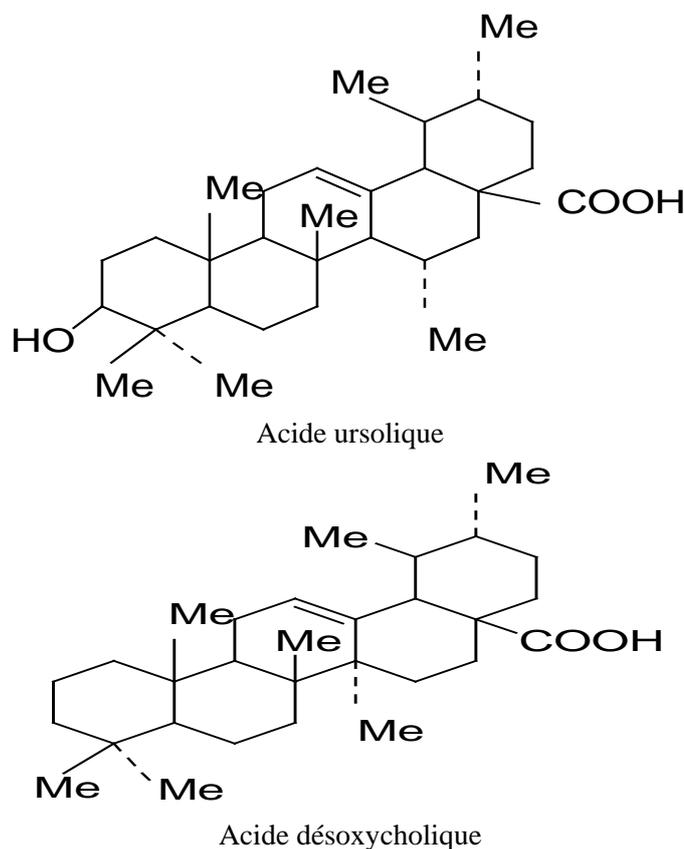


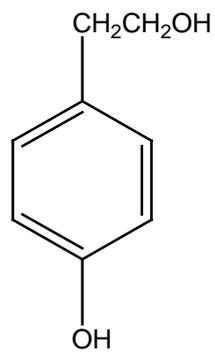
Figure I. 4 : Des acides pentacycliques hydroxyterpéniques ont également été signalés dans l'huile d'olive.

I.4.7 COMPOSES VOLATILS ET AROMATIQUES

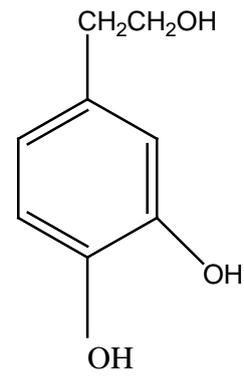
L'huile d'olive possède une place unique parmi les huiles végétales en grande partie en raison de la mode d'extraction et à la présence d'arômes volatils et non volatils composés. Les

constituants les plus importants de l'arôme de l'huile d'olive sont C6 les aldéhydes et les alcools formés dans le fruit à partir d'acides gras polyinsaturés. Cela a lieu lors de l'écrasement, la première étape du traitement. Le tissu végétal est perturbé et une séquence de réactions catalysées par la lipoxygénase se produit. Le hydroperoxydes formés par oxydation d'acides gras polyinsaturés (18 : 2 et 18 : 3) sont décomposés par une lyase spécifique donnant des aldéhydes de six ou neuf les atomes de carbone et les oxo-acides en C12 ou en C9. Les aldéhydes formés sont transformés aux alcools correspondants en réduisant les enzymes ayant une activité déshydrogénase ou à des esters d'hexyle avec des transférases spécifiques. Aujourd'hui, plus de 100 constituants ont été identifiés et les mécanismes pour leur formation ont été expliqués. Les classes les plus importantes de volatiles sont des hydrocarbures, des alcools, des aldéhydes, des esters, des phénols, des dérivés du phénol, des terpènes oxygénés et des dérivés du furane Boskou [26], Reiners et Grosch [27], Morales et Aparicio [28], Morales et Tsimidou [29]. Certains des composés volatils sont inodores (par exemple l'octane), tandis que d'autres, à moins dans les concentrations trouvées, ne font qu'une très petite contribution à l'arôme. Dans une série de papiers Grosch et *al* [30] Blekas et *al* [31], Guth et *al* [32] ont indiqué que seule une petite quantité du mélange complexe de substances volatiles provoque l'odeur caractéristique d'huile d'olive. Pour mesurer la puissance des odorants, ils ont appliqué une technique appelée Analyse de dilution de l'extrait d'arôme' (AEDA), c'est une méthode de dépistage appliquée aux volatiles distillés dans le vide poussé. Une aliquote de l'échantillon est diluée dans éther diéthylique et analysé par chromatographie gazeuse capillaire alors que l'effluent du capillaire est reniflé. L'aliquote est ensuite diluée dans un volume 1 : 1 et le nouvel échantillon est analysé à nouveau. La procédure continue jusqu'à ce que l'odeur ne soit plus détectée. De cette manière, le facteur de dilution de l'arôme (FD- Factor) est estimé. Les FDFactors sont des mesures relatives et sont proportionnelles à la valeur de l'activité odorante (OAV) qui est le rapport entre la concentration et le seuil d'odeur du composé dans une huile inodore. Grosch et ses collègues ont conclu que les composés contribuant principalement à quatre notes de saveur de base sont :

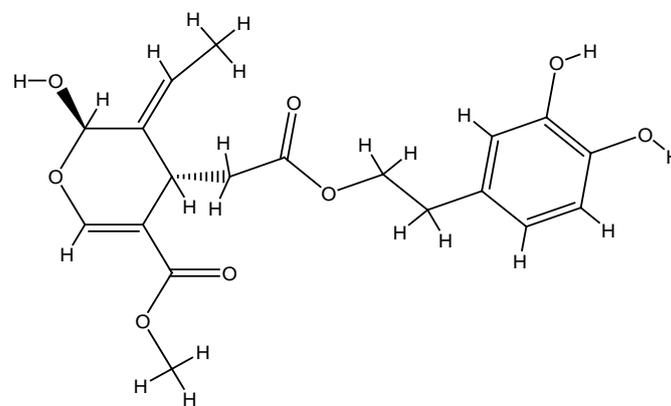
- vert : (Z) -3-hexénal
- fruité : 2-méthylbutyrate d'éthyle, isobutyrate d'éthyle, cyclohexylcarboxylate d'éthyle
- gras : (Z) -2-nonenal
- la cassis : le 4-méthoxy-2-méthyl-2-butanethiol.



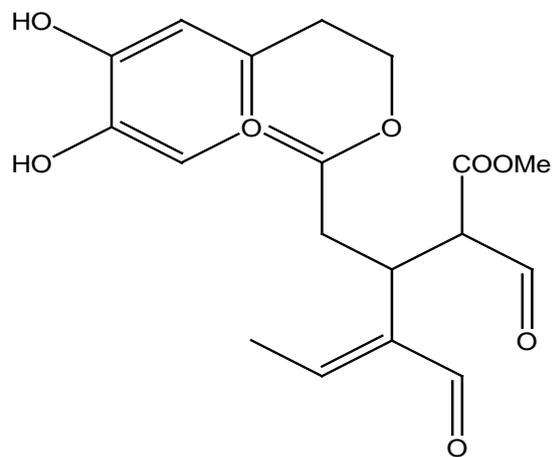
Tyrosol



Hydroxytyrosol



L'aglycone d'Oleuropéine



Forme aldéhydrique d'oleuropéine aglycone

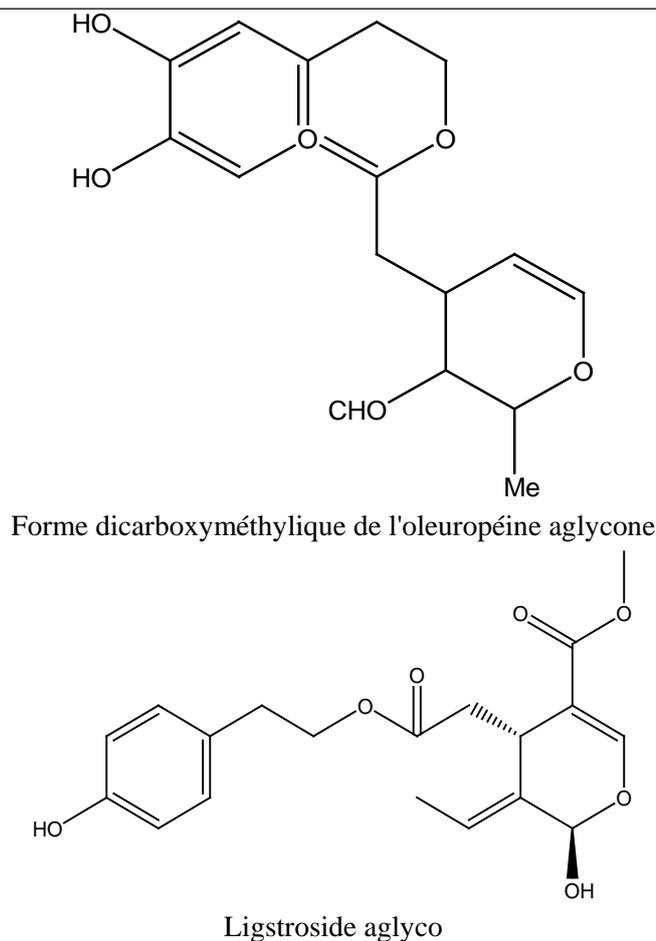


Figure I. 5 : Structures des principaux composés phénoliques signalés dans l'huile d'olive : le tyrosol, hydroxytyrosol et dérivés.

D'autres substances odorantes importantes [33-35] sont données ci-dessous :

hexanal vert, (E) -2-hexénal, (E) -3-hexène-1-ol, (E) -2-hexén-1-ol, (Z) -3-hexén- 1-ol.

- fruité (E) -2- hexénal, acétate d'hexyle,
- (Z) -3-hexényl acétate, le 2-méthylpropanoate d'éthyle, (Z) -3-hexényl acétate.
- heptanal gras, (E) -2-nonénal, (E) -2-octénal, (Z) -3-nonénal, (E) -2-décénal
- hexanal herbeux, (Z) -3-hexène-1-ol
- nonanal savonneux, octanal
- 2,4-decadienal frit
- phénylacétaldéhyde doux, acétate d'hexyle
- (E) -2-hexène-1-ol astringent-amer, (E) -2-hexénal.

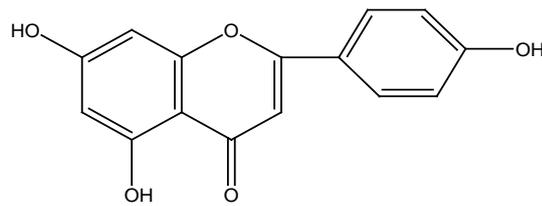
Les OAV ont été calculés pour les odorants puissants dans les huiles d'Italie, d'Espagne et Maroc par Reiners et *al* [36]. Après quantification, les concentrations des odorants ont été divisés sur la base de leur seuil déterminé par voie nasale valeurs dans l'huile de tournesol. Des OAV élevés ont été montrés par les composés suivants :

- huiles d'Italie : acétaldéhyde, acide acétique, propanal, 1-pentène-3-one, (E, Z) -2,4-

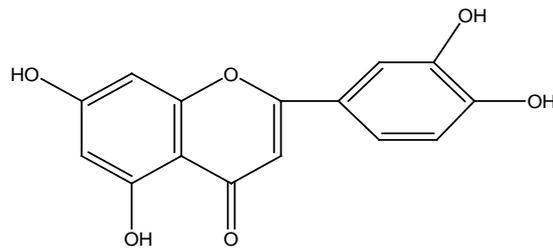
décadiénal, acétate de (Z) -3-hexényle, trans-4,5-époxy- (E) -2- décénal, (Z) -3-hexénal et (E) -2-hexénal

- huiles d'Espagne : acétaldéhyde, acide acétique, trans-4,5-époxy- (E) -2- décénal, 4-méthoxy-2-méthyl-2-butanethiol, 2- et 3-méthyle d'éthyle butyrate et 3-méthyl butanal

- huiles du Maroc : acétaldéhyde, (E, Z) -2,4-décadiénal, trans-4,5-époxy- Le (E) -2-décénal, le (Z) -3-hexénal, le 2- et 3-méthyl butyrate d'éthyle, le cyclohexylcarboxylate d'éthyle et l'isobutyrate d'éthyle.

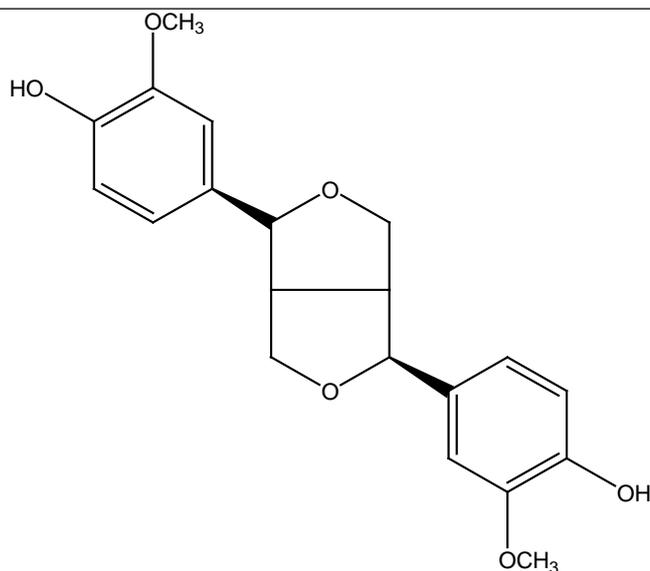


Apigenine



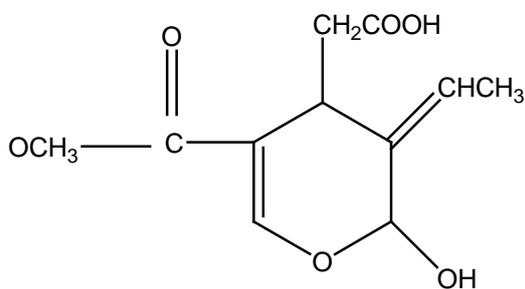
Luteolin

Figure I. 6 : Structures des principaux composés phénoliques rapportés dans l'huile d'olive : flavonoïdes.



Pinoresinol

Figure I. 7 : Structures des principaux composés phénoliques signalés dans l'huile d'olive : lignanes.



Acide élénolique

Figure I. 8 : Composés non phénoliques étroitement apparentés extraits avec des phénols.

I.4.8 PHOSPHOLIPIDES

Le travail expérimental pour la détermination des phospholipides dans l'huile d'olive est plutôt limité. L'huile d'olive vierge fraîchement produite contient 40-135 mg / kg. L'huile de grignon brute a des niveaux plus élevés de phospholipides. Phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylinositol et l'acide phosphatidique sont les principaux phospholipides présents dans l'huile non traitée. Les phospholipides sont en partie liés aux lipoprotéines.

I.4.9 LES METAUX

Les métaux de transition, en particulier le fer et le cuivre, sont connus comme des facteurs pro-oxydants, car ils génèrent des radicaux libres. Dans les traces d'huile d'olive vierge de fer et le cuivre peut provenir du sol et des engrais ou être contaminé par l'équipement de traitement et les cuves de stockage. L'utilisation de l'acier inoxydable l'équipement est nécessaire pour éviter la contamination par les métaux. Les concentrations de fer rapporté pour l'huile d'olive vierge se situent généralement entre 0,5 et 3 ppm (Boskou 1996). Les valeurs indiquées pour le cuivre sont de 0,001-0,2 ppm. Le fer et le cuivre le contenu est lié, au moins en partie, au système utilisé pour l'extraction du pétrole.

I.5 EFFET DU TRAITEMENT DES HUILES SUR LA COMPOSITION D'HUILES D'OLIVE

I.5.1 COMPOSES AROMATIQUES

Le broyage et le pétrissage de l'huile d'olive sont des facteurs importants pour les composés aromatiques. Lercker et ses collaborateurs (1999) [37] ont constaté qu'après écrasement, les la fraction volatile contenait environ 20% de trans-2-hexénal et après 70 min

de pétrissage, le pourcentage a été augmenté à 50%. Le contenu d'Hexanal était également augmenté mais son niveau reste significativement inférieur à celui de l'hexénal. Lorsque le pétrissage était terminé, une tendance différente a été observée - une augmentation de hexanal et une diminution de l'hexénal. Les auteurs ont conclu que l'enzyme forte l'activité et les périodes de pétrissage prolongées génèrent des composés aromatiques le coût de la stabilité par la perte d'antioxydants. Morales et Paricio (1999) ont étudié les conditions d'extraction et montré qu'une température de 25C° et un temps de malaxage de 30-45 min produisent des volatiles contribuant à la meilleure qualité sensorielle. Des températures plus élevées (>35 C°) avec un temps de malaxage minimum (<30 min) produisent des huiles avec des notes vertes agréables. Ranalli et ses co-chercheurs (2001) ont examiné trois variétés d'olives italiennes et quatre températures de malaxation (20, 25, 30 et 35 C°). Les résultats de l'étude ont indiqué qu'en malaxant la pâte à 30 C°, une production d'huile satisfaisante est obtenue et l'huile a une saveur verte agréable. Généralement [38], les temps de malaxation moins de 45 min et de basses températures de malaxation produisent des huiles mieux arômes et ratios (E) -2- hexénal / hexanal supérieurs. La température de malaxation est critique en raison du comportement de l'hydroxyperoxyde lyase, qui affecte le la production de substances volatiles par la voie de la lipoxygénase.

I.5.2 POLYPHENOLS

La teneur en polyphénols dépend du système d'extraction. Systèmes de pression et décanteurs à deux phases donnent une huile avec une teneur en polyphénols plus élevée et plus périodes d'induction. Dans les systèmes centrifuges triphasés, la pâte est diluée avec de l'eau et une partie des phénols est perdue dans l'eau [39]. Le type d'écrasement des fruits semble également important. Moulins en pierre donner une huile avec une teneur en polyphénols plus faible tandis que les écrasements au marteau donnent des huiles avec une teneur caractéristique élevée en phénols. Cela suggère une différence dans l'activité hydrolytique enzymatique pendant le broyage et peut être utilisé pour améliorer la qualité des huiles d'olive extra vierge. Olives produisant des huiles à très haute teneur en les polyphénols peuvent être traités dans un moulin à pierre pour éviter l'amélioration de l' « amertume » et "piquant". Pour les olives donnant des huiles « douces » avec un faible taux de polyphénols il est préférable d'utiliser le système de marteau [40]. D'autres facteurs affectant le contenu polyphénolique sont la taille de l'écran du broyeur de métaux et l'utilisation d'enzymes pectolytiques.

I.5.3 AUTRES CONSTITUANTS MINEURS

Du reste des constituants mineurs, les caroténoïdes et les chlorophylles sont affectés par le système d'extraction. Leur niveau est plus élevé dans les huiles obtenues par centrifugation, à cause des concasseurs métalliques utilisés dans ce système, qui libèrent plus de pigments. La teneur en alcools aliphatiques et en cires peut augmenter si la température de la pâte est trop élevée (Cert et al., 1999) [41].

I.6 LES COMPOSES VITAMINES

Les vitamines sont des petites molécules organiques qui ne sont pas synthétisées dans le corps et donc doit être présent dans l'alimentation [42]. Les vitamines sont commodément classées en deux groupes qui se distinguent en étant soluble (hydrosoluble) dans l'eau ou liposoluble, Les vitamines liposolubles sont Vit. A, Vit. D, Vit. E et Vit. K. Les vitamines hydrosolubles sont Vit C et les membres de Vit. B complexe, pour notre étude on s'intéresse à la vitamine E.

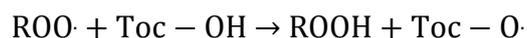
I.6.1 BIOCHIMIE DE LA VITAMINE E

La vitamine E est une molécule liposoluble essentielle dans l'alimentation humaine. La vitamine E agit pour prévenir les réactions oxydatives des acides gras insaturés et d'autres biomolécules. Le tocophérol, et le tocotriénol sont deux formes de vitamine E. Chacune de ces formes peut être subdivisée en formes α , β , δ et γ et toutes ont une activité antioxydante différente et la séparation de chacun peut être effectuée en utilisant la chromatographie liquide

à haute performance normale ou en phase inverse [43]. Les tocophérols α , β et δ sont présents en grandes quantités dans les huiles végétales.

I.6.1.1 PROPRIETE ANTIOXYDANTE DE VITAMINE E

Le stress oxydant a été défini par Sies (1991) comme un déséquilibre prononcé entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes. La vitamine E est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques. A cet égard, elle participe, avec de 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 de radicaux libres. Le mécanisme de l'activité physiologique de la vitamine E n'est pas clairement compris il est probable qu'au moins certaines des activités biologiques qui ont été démontrées soient dues à son antioxydant de fonction l'activité que biologique de la vitamine E est généralement pensée être due à son action antioxydant de peroxydation de lipide dans des membranes biologiques par la chaîne de balayage - propageant le radical de peroxyde (ROO).



La fonction antioxydante de la vitamine E intrinsèquement est localisée au noyau de chromanol, tandis que le groupe hydroxy phénolique donne un atome de H pour éteindre le radical de lipide [44].

I.6.1.2 ROLE BIOLOGIQUE DE LA VITAMINE E

- Elle stabilise les membranes cellulaires.
- Elle diminue l'activité de la lipoxygénase des plaquettes.
- Elle exerce un effet régulateur sur la synthèse de l'hème et des enzymes hémiques.
- Elle a une action sur le métabolisme des globules rouges.

I.6.2 CHIMIE DE LA VITAMINE E

I.6.2.1 DEFINITION IUPAC DE LA VITAMINE E

La vitamine E est le terme collectif pour le 6-hydroxychroman liposoluble composés qui présentent l'activité biologique de l' α -T mesurée par le rat essai de résorption-gestation. Tocol 2-méthyl-2- (4', 8', 12'- triméthyltridécyl) -chromane-6-ol) est généralement considéré comme le parent composé des tocophérols[45].

Tableau I. 3 : Noms chimique de tocophérols et tocotriénols.

Tocophérols					
Nom	Nom chimique	Abréviation	R	R ²	R ³
Tocol	2-méthyl-2(4',8',12'- Triméthyltridecyl) Chroman-6-ol		H	H	H
α-Tocophérol	5,7,8-Triméthyltocol	α-T	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-Tocophérol	5,8-Diméthyltocol	β-T	CH ₃	H	CH ₃
γ-Tocophérol	7,8-Diméthyltocol	γ-T	H	CH ₃	CH ₃
δ-Tocophérol	8-Méthyltocol	δ-T	H	H	CH ₃
Tocotriénol					
Nom	Nom chimique	Abréviation	R	R ²	R ³
Tocol	2-méthyl-2(4',8',12'- Triméthyltrideca-3',7',11' trienyl) Chroman-6-ol		H	H	H
α-Tocotriénol	5,7,8Triméthyltocotriénol	α-T3	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-Tocotriénol	5,8 Diméthyltocotriénol	β-T3	CH ₃	H	CH ₃
γ-Tocotocotriéno l	7,8 Diméthyltocotriénol	γ-T3	H	CH ₃	CH ₃
δ-Tocotriénol	8,Méthyltocotriénol	δ-T3	H	H	CH ₃

I.6.2.2 STRUCTURES CHIMIQUES ET NOMENCLATURE

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols Cette famille comprend 4 substances α, β, δ et γ Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurelles avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols l'α-tocotriénol, le β- tocotriénol, le γ- tocotriénol et le δ-tocotriénol. La nomenclature des tocophérols (T) et tocotriénols (T3). Les termes « tocophérol » et « tocotriénol » désignent donc, quant à eux, des entités chimiques bien définies.

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou triméthylé avec des chaîne carbonées latérale saturée de 16 carbones. La structure chimique des tocotriénols se compose également d'un cycle chromanol mono-, di- ou triméthylé avec chaîne carbonée latérale, mais celle-ci contient 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11' les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles., mais celle-ci contient 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11'.

Tableau I. 4 : La dénomination des tocotriénols (T3) en fonction de leurs substituants est la suivante :

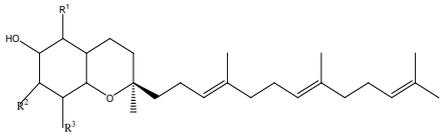
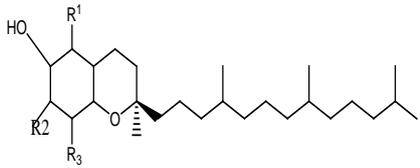
Substituants des tocotriénols	R ¹	R ²	R ³	NOM
	CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocotriénol
	CH ₃	H	CH ₃	β-tocotriénol
	H	CH ₃	CH ₃	γ-tocotriénol
	H	H	CH ₃	δ-tocotriénol

Tableau I. 5 : Structure et dénomination des quatre tocophérols :

Substituants des tocophérols	R ¹	R ²	R ³	NOM
	CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocophérol
	CH ₃	H	CH ₃	β-tocophérol
	H	CH ₃	CH ₃	γ-tocophérol
	H	H	CH ₃	δ-tocophérol

I.6.2.3 PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE VITAMINE E

Les tocophérols sont insolubles dans l'eau, par contre ils sont solubles dans les solvants organiques comme le méthanol, l'éthanol et l'acétonitrile. Ils sont peu sensibles à la chaleur, ils présentent une sensibilité à la lumière.

Tableau I. 6 : les propriétés physicochimiques des composés de la vitamine E

Substance	Masse molaire (g/mol)	λ _{max} (nm)	E _{1%} ,1cm	ε (l.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)
α-tocophérol	430.7	292	75.8	3265
β-tocophérol	416.7	296	89.4	3730
γ-tocophérol	416.7	298	91.4	3810
δ-tocophérol	402.7	298	87.3	3520
α-tocotriénol	424.7	292	91.0	3870
β-tocophérol	410.7	295	87.5	3600
γ-tocophérol	410.7	298	103.0	4230
δ-tocophérol	396.7	292	83.0	3300

I.6.2.4 LES PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DE LA VITAMINE E

La lumière est une onde électromagnétique composée de deux vecteurs oscillants : un champ électrique E et un champ magnétique H [46]. 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 :

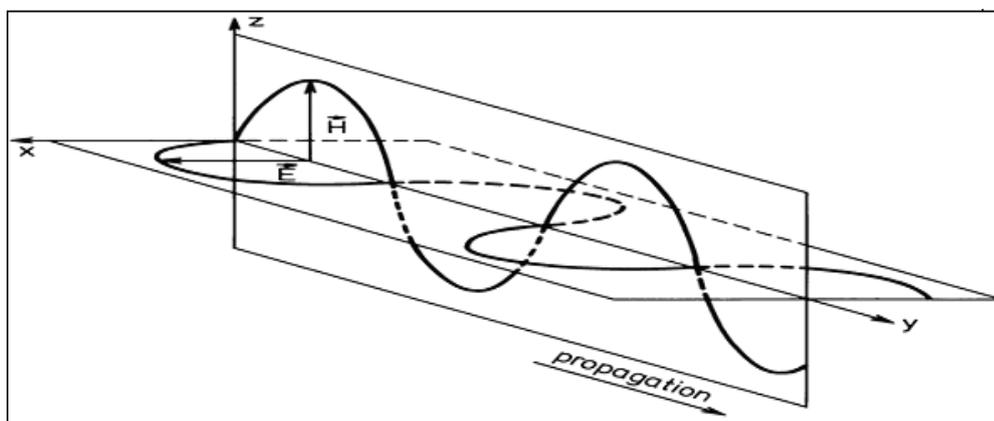


Figure I. 9 : Schéma d'une onde électromagnétique.

La région de l'ultraviolet se situe de 200 à 350 nm, tandis que celle du visible s'étend de 350 à 800 nm. Les spectres UV des tocophérols et les tocotriénols dans l'éthanol montrent une absorption maximale entre 292 et 298nm, l'absorption minimale se situe entre 250 et 260 nm.

Les tocophérols et les tocotriénols possèdent une forte fluorescence, Les esters de vitamine E possèdent une faible fluorescence par rapport aux alcools.

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 : constant de planck ($h= 6,023 \times 10^{-34}$ j.s)

ν : Fréquence du rayonnement (s^{-1}) ou $\nu = \frac{c}{\lambda}$

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 :

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

Avec :

C : Vitesse de la lumière dans le vide ($C = 3.108$ m.s⁻¹)

λ : Longueur d'onde (nm).

I.6.2.4.1 TRANSITIONS ELECTRONIQUES

-Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Un électron saute d'une orbitales moléculaires liante σ dans une orbitales antiliantes σ^* demande beaucoup d'énergie [47].

-Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Un électron saute d'un doublet n des atomes O, N, Cl ... dans une orbitales moléculaires

-Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

Concernent les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée.

I.6.2.4.2 MESURE DE L'ABSORBANCE

Il en est résulté la loi de Beer et Lambert présentée ici sous sa forme actuelle [47] :

$$A = \epsilon lc$$

A : désigne l'absorbance, paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre

L : est l'épaisseur (en cm) de la solution traversée

C : la concentration molaire

ϵ : le coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) à la longueur d'onde λ à laquelle on fait la mesure.

En appelant I_0 l'intensité lumineuse de la radiation incidente en amont du milieu traversé d'épaisseur l

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

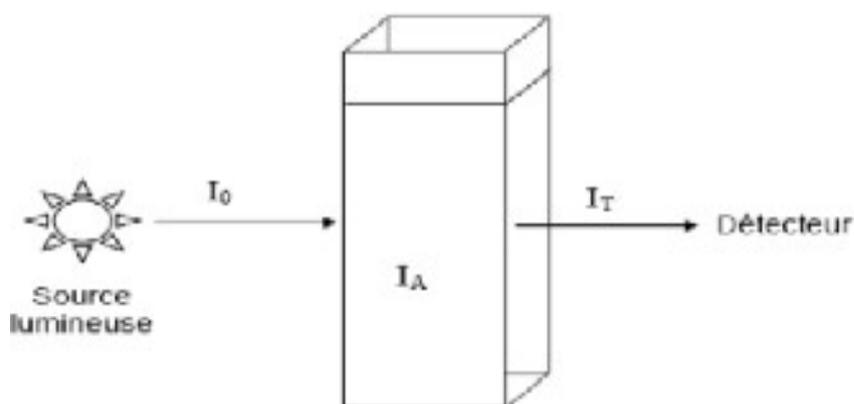


Figure I. 10 : Principe de mesure de l'atténuation du rayonnement.

Cette loi, qui ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, est vérifiée dans les conditions suivantes :

- ✚ La lumière utilisée doit être monochromatique ;
- ✚ Les concentrations doivent être faibles ;
- ✚ La solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène ;
- ✚ Le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques ;
- ✚ Le soluté ne doit pas donner des associations variables avec le solvant.

La loi de Beer Lambert appliqué aussi pour les mélanges contenant plus d'une substance absorbante selon l'équation : $A_T = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \varepsilon_3 c_3 l + \dots + \varepsilon_n c_n l$

CHAPITRE II : Analyse de la vitamine E par HPLC

II.1 LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

II.1.1 PRINCIPE

En HPLC, les analytes sont séparés en fonction de leur affinité différentielle entre une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide. La cinétique de distribution des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile est largement contrôlée par diffusion. La diffusion dans les liquides est lente et peut être négligé. Pour minimiser le temps requis pour l'interaction des analytes entre la phase mobile et la phase stationnaire, deux critères devraient être remplis. Premièrement, les particules d'emballage devraient être petites et aussi uniformément et densément emballé que possible. Deuxièmement, la phase stationnaire devrait être effectivement film mince uniforme sans piscines stagnantes. Les composés sont identifiées grâce à un détecteurs (réfractométrique, absorptiométrique...etc), le chromatogramme représente ensemble des pics enregistrés. La chromatographie liquide à haute performance basé sur la séparation, l'identification et la quantification des composés chimiques[48].

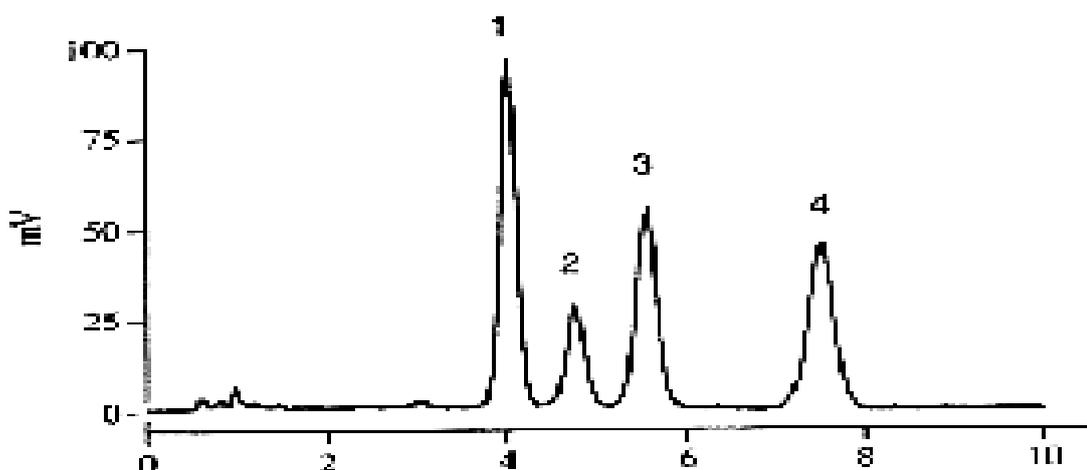


Figure II. 2 : Analyse de tocophérols par chromatographie liquide a haute performance. 1 correspond à δ -tocophérol, 2 à γ -tocophérol, 3 à α - tocophérol, 4 à β -tocophérol.

II.1.2 LE MODE DE CHROMATOGRAPHIE

Les techniques de chromatographie liquide peuvent être groupées en tenant compte de la nature de la phase mobile, il existe deux méthodes de séparation en HPLC [48].

La chromatographie liquide à haute performance en phase normal.

La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse.

II.1.3 LA PHASE STATIONNAIRE

Dans la chromatographie liquide-liquide, la phase stationnaire est un film liquide enduit sur matériau de garnissage constitué des particules de silice poreuses de 3 à 10 μm [49]. La phase stationnaire peut être partiellement soluble dans la phase mobile, les phases stationnaires collées sont fixées en faisant réagir les particules de silice avec un organochlorosilane de forme générale $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$ ou R est un alkyl ou groupe alkyl substitué.

Les propriétés d'une phase stationnaire sont déterminées par la nature de groupe alkyle d'organosilane. Si R est groupe fonctionnel polaire, alors le groupe de la phase stationnaire sera polaire.

II.1.4 LA PHASE MOBILE

L'ordre d'éluion des solutés en HPLC est régi par la polarité. Les temps de rétention sont contrôlés en sélectionnant la phase mobile, avec une phase mobile moins polaire conduisant à des temps de rétention plus longs, le passage à une phase mobile plus polaire peut fournir une séparation avec un temps d'analyse plus court. Dans une séparation en phase inverse, l'ordre d'éluion est inversé, le soluté le plus polaire étant le premier à être élu. En augmentant la polarité de la phase mobile conduit à un temps de rétention plus longs, tandis que la rétention plus courte. Les temps nécessitent une phase mobile de plus faible polarité.

II.1.5 DETECTION

Il existe plusieurs méthodes pour la détection de la vitamine E dans le cas de la séparation par chromatographie liquide à haute performance.

- détecteur à diffusion de lumière (ELSD)
- détecteur ultraviolet (UV)
- détecteur électrochimique (ED)
- détecteur de fluorescence (FL)

Les techniques de détection leur sensibilité respecte l'ordre suivantes :

ED \rightarrow FL \rightarrow UV \rightarrow ELSD.

II.1.6 DESCRIPTION DU SYSTEME HPLC UTILISE



Figure II. 3 : Système HPLC du Laboratoire de Recherche « Spectrochimie et Pharmacologie Structurale ».

-Réservoirs de la Phase mobile

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvant qui doit être pure et filtré pour éliminer les particules solides, il faut utiliser des solvants qui n'absorbent pas à la même longueur d'onde que l'analyte [49]. La longueur maximale de la vitamine E est 292 nm. Si la phase mobile est un mélange de solvants ceux-ci doivent être miscibles.

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

La phase mobile devra être dégazée, dissous les gaz sortent de la solution lorsque les éluants sont pompés à travers le système.

- 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.

- Pompe LC-10ADvp, Shimadzu

La pompe permet de déplacer la phase mobile avec deux pistons qu'ils vont travailler en alternance. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés.

- Mixeur, N° 228-28000-91

Dans le cas d'élution en mode gradient il permet de mélanger efficacement la phase mobile.

- Injecteur

L'échantillon est introduit dans le chromatographe via un injecteur d'échantillon. La vanne d'injection a deux positions :

La position de charge

La vanne est commutée sur la charge position, l'échantillon chargé dans la boucle d'échantillonnage ne pas introduire des bulles d'air.

INJECT

La phase mobile est utilisée pour rétrolaver, l'échantillon de la boucle et dans la colonne.

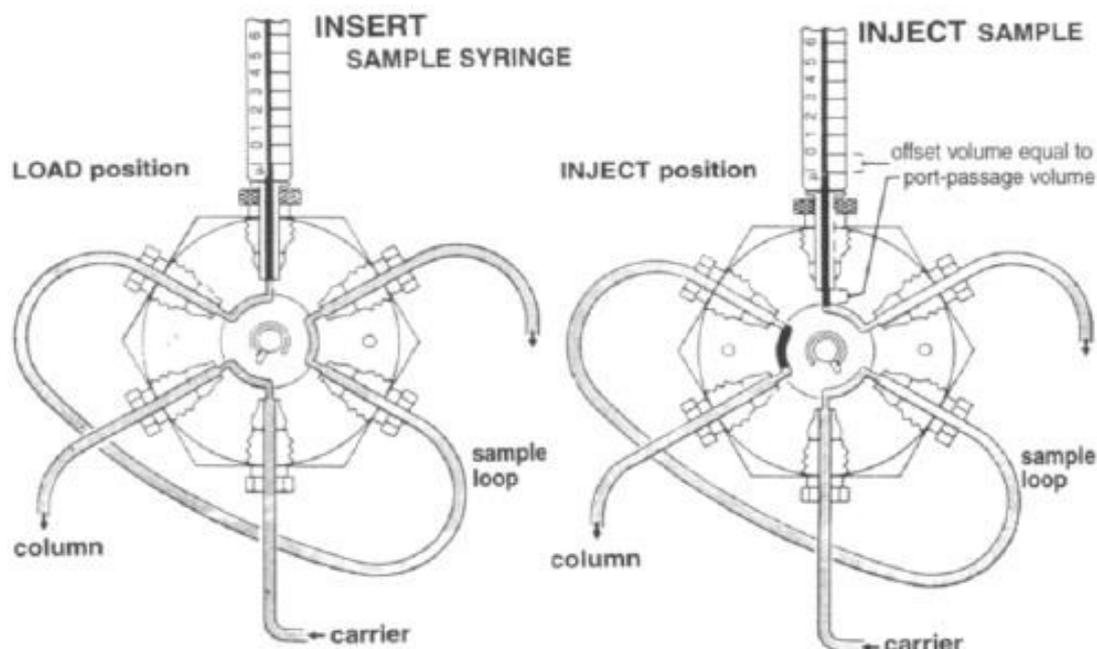


Figure II. 4 : les positions d'une vanne à six voies.

-Colonne de garde

Elle est utilisée pour protéger la colonne analytique contre la perte d'efficacité.

- Colonne analytique : RP-HPLC

La colonne est le cœur du chromatographe, c'est une phase inverse pour que la phase stationnaire est non polaire qui se compose de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones. Cette colonne a un diamètre interne de 4.6 mm, longueur 25 cm et de diamètre de particule 5µm.

- Détecteur SPD-10Avp. Shimadzu

Il est pratique d'utiliser des détecteurs de surveillance continue à la sortie de la colonne.

Les détecteurs d'absorption sont non destructeurs, c'est un détecteur UV-VISIBLE qui couvrent la gamme 190-700 nm est le plus largement utilisée parce que du grand nombre de composés qui absorbent le rayonnement dans la gamme UV.

Le détecteur en ligne idéal a la polyvalence, la haute sensibilité, la capacité pour la surveillance continue des effluents de la colonne, faible niveau de bruit, large linéarité de la réponse [50].

-Système de traitement des données

C'est un logiciel LCsolution qui permet d'enregistrer et visualiser le signal de sortie du détecteur du système HPLC. Il offre deux types d'applications analyse de temps réel et analyse en différé.

II.2 TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

II.2.1 LES PROCEDES D'OBTENTION

La teneur en tocophérols varie de 52 à 87% α -tocophérol et β -tocophérols varie de 15-20% et γ -tocophérols de 7-23%. L'importance de la vitamine E est due à leurs effets antioxydants alors leur composition dépendent de nombreuses variables, telles que le cultivar d'olives,

Origine. L'identification rapide, la caractérisation, et quantification de la vitamine E est réalisé par HPLC avec différents systèmes de détection.

II.2.2 L'EXTRACTION LIQUIDE –LIQUIDE (ELL)

Dans un protocole typique, une quantité d'huile est dissoute dans un dissolvant lipophile, habituellement hexane, et est extraite au moyen du méthanol ou un mélange de méthanol.eau. Les produits est introduit dans une ampoule à décanter [51]. L'extraction est effectuée par l'agitation simple ou par la sonication pendant quelques minutes, les phases sont séparées par centrifugation.

Les deux phases sont séparées, et la phase de méthanoïque aqueuse est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide.

II.3 ANALYSE QUANTITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

Le développement considérable pris par la chromatographie en analyse quantitative est dû essentiellement à sa fiabilité et sa précision [52]. Elle est basée sur la relation reliant l'aire du pic ou la hauteur du pic de l'analyte à sa concentration.

Cette relation est valable pour une plage de concentration qui dépend du détecteur employé.

$$C_i = K_i \cdot A_i$$

$$C_i = K_i \cdot H_i$$

C_i : la concentration du composé i injectée dans la colonne

K_i : coefficient de réponse absolu du composé i

A_i : aire du pic

Le principe de l'analyse quantitative est de tracer une courbe représentant la variation d'aire en fonction de la quantité d'analyte.

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

a : pente de la droite

b : ordonné à l'origine

II.3.1 AIRES DES PICS ET LOGICIELS DE CHROMATOGRAPHIE

On utilise les fonctions spécialement prévues des logiciels de chromatographie pour déterminer les aires des pics [47]. Tous les logiciels permettent d'effectuer des corrections de ligne de base, et de choisir une méthode d'intégration pour les pics.

II.3.2 METHODE D'ETALONNAGE INTERNE

Ce type d'étalonnage est utilisé lorsque l'analyste présente une mauvaise répétabilité ou une mauvaise reproductibilité. Le principe consiste à comparer les surfaces des pics du mélange avec un étalon pris comme référence.

Les solutions sont préparées à partir de la substance de référence, auxquelles on a ajouté une quantité d'étalon interne. On injecte la gamme des solutions étalon et on porte le rapport des aires des pics obtenus :

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

On obtient une droite d'étalonnage dont on peut déterminer l'équation par régression linéaire:

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

$A_{ét}$: Aire de pic de l'analyte

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

$C_{ét}$: Concentration de l'analyte

C_{int} : Concentration de l'étalon interne

a: Pente de la droite

b: Ordonnée à l'origine.

L'intérêt de la méthode est que si le volume d'injection varie $A_{ét}$ et A_{int} sont modifiés dans les mêmes proportions et leur rapport n'est donc pas modifié, on s'affranchit donc des erreurs d'injection.

Pour trouver la concentration de l'échantillon inconnue, La concentration est déterminée $C_{ét}$ à partir des deux aires obtenu ($A_{ét}$ et $A_{int(ét)}$) suivant la relation :

$$C_{ét} = \frac{\frac{A_{ét}}{A_{int(ét)}} - b}{a} \times C_{int(ét)}$$

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

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

II.3.3 METHODE D'ETALONNAGE EXTERNE

Cette méthode permet de calculer la teneur d'un ou plusieurs constituants apparaissant séparés sur le chromatogramme. Pour cela on prépare une gamme de solutions étalons que l'on injecte tour à tour. Si la gamme des concentrations a été bien choisie, on obtient une droite d'étalonnage passant par l'origine.

Cette méthode est la plus précise et la plus fiable mais on préfère parfois simplifier le processus d'injectant qu'une seule solution étalon.

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

$$A_{ét} = a.C_{ét} + b$$

Où

$A_{ét}$: Aire de pic de l'étalon pur

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

a: Pente de la droite,

b : Ordonnée à l'origine.

Pour trouver la concentration de l'échantillon inconnue, la concentration est calculée par

deux manières :

- Soit par projection de la valeur d'aire sur la droite en utilisant un logiciel approprié.
- Soit par l'équation de la droite suivant la relation :

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

Partie expérimentale

**CHAPITRE III : Dosages des échantillons d'huile d'olive par RP-
HPLC**

III.1 MATERIELS ET METHODE

III.1.1 MATERIELS

- ❖ 1 fiole jaugée de 50 ml,
- ❖ Micropipettes (1000 μ l) ,
- ❖ 2 béchers de 25 ml,
- ❖ 1 flacon de 15 ml,
- ❖ Tubes de 8 ml,
- ❖ Papier d'aluminium,
- ❖ Spectrophotomètre UV-Visible,
- ❖ Cuvette,
- ❖ Solution stock de l' α -tocophérol.

III.1.2 METHODE

Dans 7 tubes on met 5 ml d'huile d'olive puis on ajoute 5 ml des solvants suivants : Méthanol- Acétonitrile – Ethanol – Acétate d'éthyle - Ether de pétroleum-Propanol-2 – Butanol, on agite au vortex pendant 5 minute puis on dépose les mélanges pour congélation.

Pour les solvants polaires on obtient deux phases mais pour les solvants peu polaires ou apolaires on obtient une seule phase.

On injecte un volume de 20 μ L de surnageant dans le système chromatographique dans les conditions suivantes :

-Phase mobile:(60% CH₃OH ; 40% CH₃CN)

-Phases stationnaires : C-8 et C-18

-Débit : 1.5ml/min

-Détection : à (λ =292 nm et 298 nm)

-Durée d'analyse : 15 min

-Température ambiante : 19 C°

III.1.3 TRAITEMENT DES ECHANTILLONS D'HUILE D'OLIVE

La première étape consiste en une préparation de l'échantillon avant l'analyse. La réalisation de cette étape dépend de la précision de volume de l'échantillon d'huile d'olive, le choix de bon solvant qu'il doit être complètement miscible avec l'échantillon, doit être compatible avec le système de détection, doit avoir une polarité convenable.

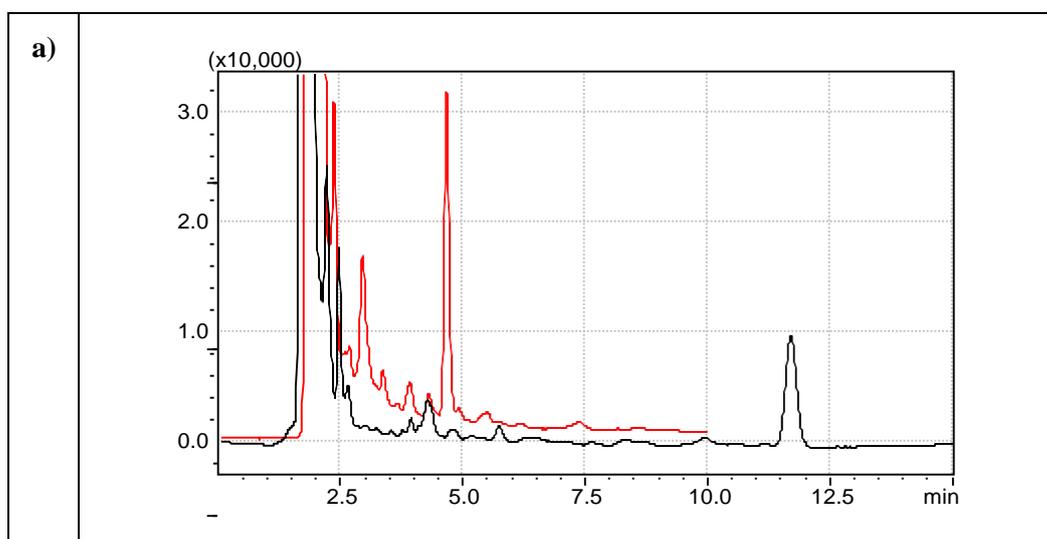
III.2 RESULTATS ET DISCUSSION

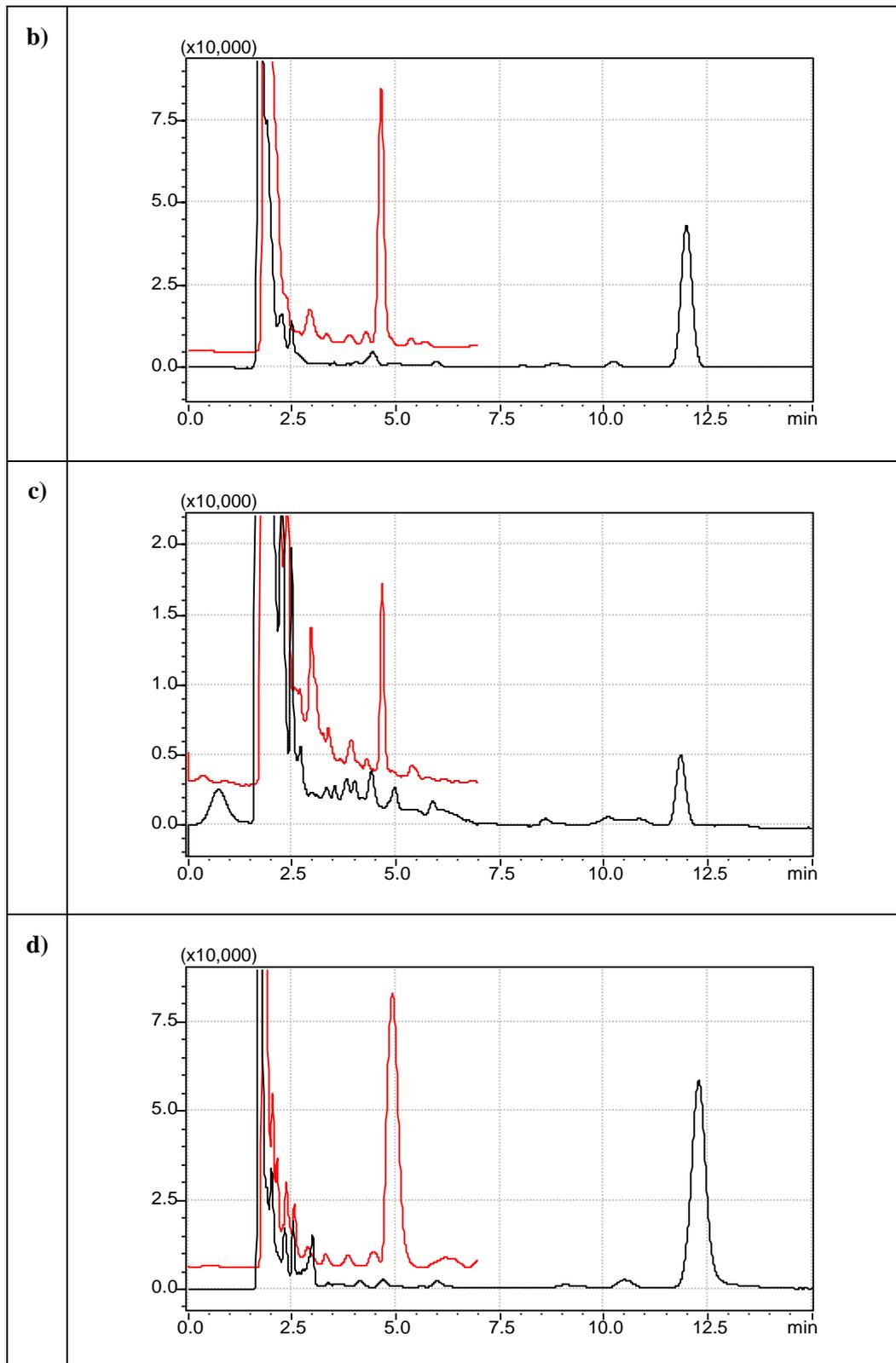
III.2.1 ANALYSE QUALITATIVE

III.2.1.1 CHOIX DE LA PHASE STATIONNAIRE

La figure (III.1) compare les chromatogrammes obtenus sur les deux phases stationnaires, C-8 et C-18, avec les mêmes conditions chromatographiques, après traitement d'un même échantillon d'huile par différents solvants. Comme on le voit bien, tous les chromatogrammes ont la même forme, pour l'ensemble des solvants utilisés. Par contre, on remarque que ceux obtenus sur C-8 montre l'avantage de cette dernière à réduire énormément le temps d'analyse en conservant toujours le nombre de pics identifiés, par rapport à la séparation sur la phase stationnaire C-18. Cette observation nous oriente à choisir sans difficulté la phase stationnaire C-8, pour la suite de cette étude.

Néanmoins, la seule anomalie détectée ici, consiste dans la différence de la taille des pics, d'un solvant à un autre, comme c'est nettement constaté sur le pic majoritaire élué en dernier. Ceci, révèle plutôt un aspect quantitatif plus que qualitatif, ce qui va servir justement à bien choisir le solvant d'extraction le mieux approprié par les sept étudiés.





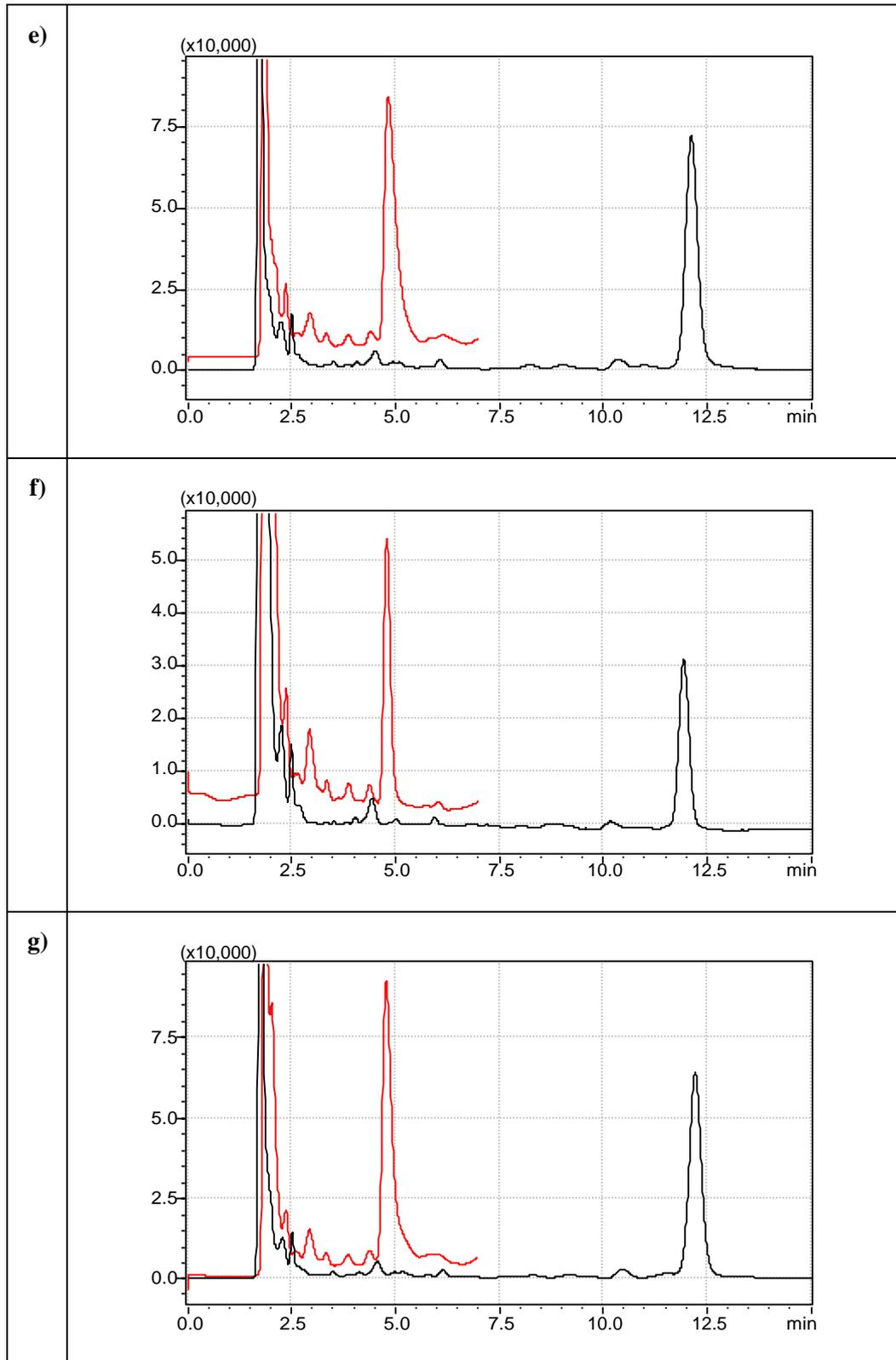


Figure. III. 1 : comparaison des chromatogrammes sur phase stationnaires C8 (haut) et C18 (bas), obtenus après injection des échantillons traités par les solvants : a) Méthanol, b) Propanol, c) Acétonitrile, d) Ether de pétrole, e) Acétate d'éthyle, f) Ethanol, g) Butanol.

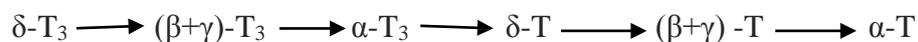
III.2.1.2 CHOIX DU SOLVANT D'EXTRACTION

Le choix du solvant approprié pour le traitement des échantillons d'huile, s'est basé sur une comparaison quantitative des aires de pics identifiés à différents temps de rétention, principalement la quantité d'aire du pic majoritaire. Le tableau (III.1) résume ces quantités d'aire pour l'ensemble des extractions réalisées.

Tableau III.1 : Données quantitatives sur l'efficacité de l'extraction de différents solvants

tR (min)	1 (2.38)	2 (2.94)	3 (3.32)	4 (3.85)	5 (4.38)	6 (4.77)
Solvants						
MeOH	81924	84504	12529	21521	13982	198581
MeCN	61970	19868	6877	13947	4028	87849
PrOH	65247	89305	14918	27219	30730	718765
EtOH	59186	105813	15205	23595	29563	574326
BuOH	56277	95475	21670	28378	35688	1.44898E6
Ether de Pétrole	59017	43891	20833	33217	41031	1.41308E6
Acétate d'éthyle	64159	83771	22394	33150	31932	1.46236E6

L'acétate d'éthyle, l'éther de pétrole et le butanol donnent les plus grandes quantités de l'air du pic majoritaire, comparés aux solvants polaires. Par rapport, a ce qui a été rapporté par [53]. Les pics identifiés correspondent probablement aux composés de la vitamine E, les moins polaires sont retenus plus longtemps dans la phase stationnaire et peuvent être sortir par ordre croissant d'hydrophobicité selon la séquence suivante :



Ces données sont représentés sur la figure (III.2), pour bien illustré cette affinité.

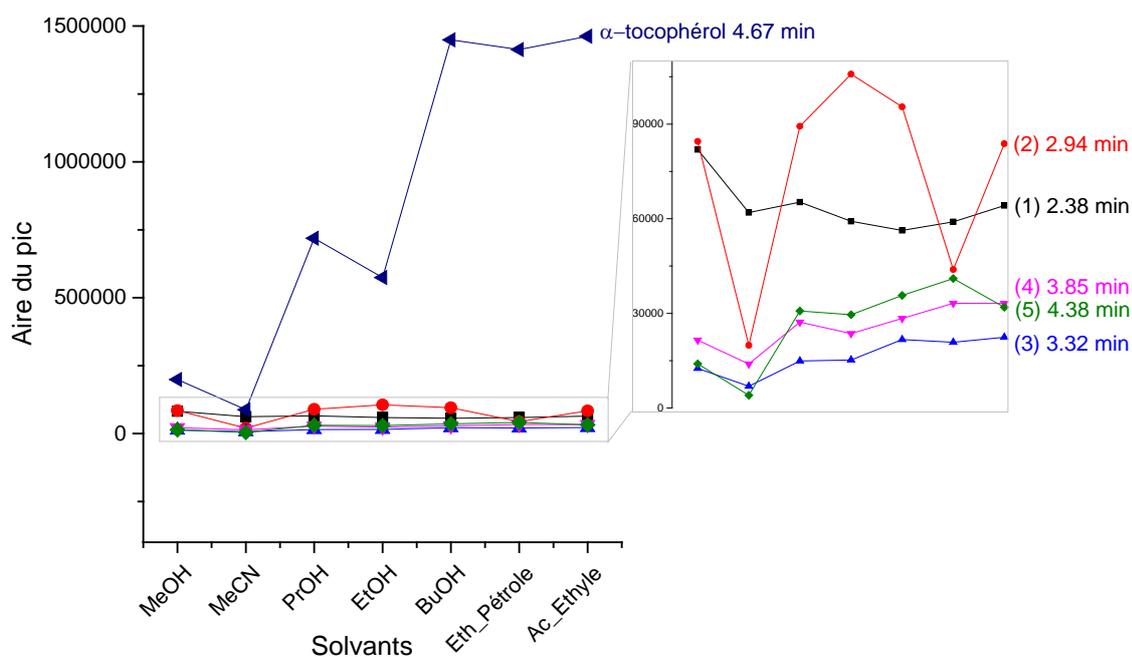


Figure III. 2 : Comparaison de l'efficacité de sept solvants, pour extraire six vitamines de la vitamine E.

Les solvants apolaires sont beaucoup plus favorables dans le traitement de l'échantillon d'huile d'olive, par rapport aux solvants polaires. L'acétate d'éthyle donne l'extraction maximale parmi l'ensemble des solvants étudiés.

III.3 IDENTIFICATION DE L'ALPHA TOCOPHEROL

L'identification se base généralement, par la comparaison de temps de rétention des pics du chromatogramme de l'échantillon à celui de l'étalon pur. La figure III.3 montre cette identification a été bien réalisé pour l' α -tocophérol, qui représente le pic majoritaire élué à (4.67 min). D'autres pics de tailles différentes sont détectés à différents temps de rétention et sont probablement, des composés de vitamine E, selon la séquence d'hydrophobicité mentionnée auparavant [54].

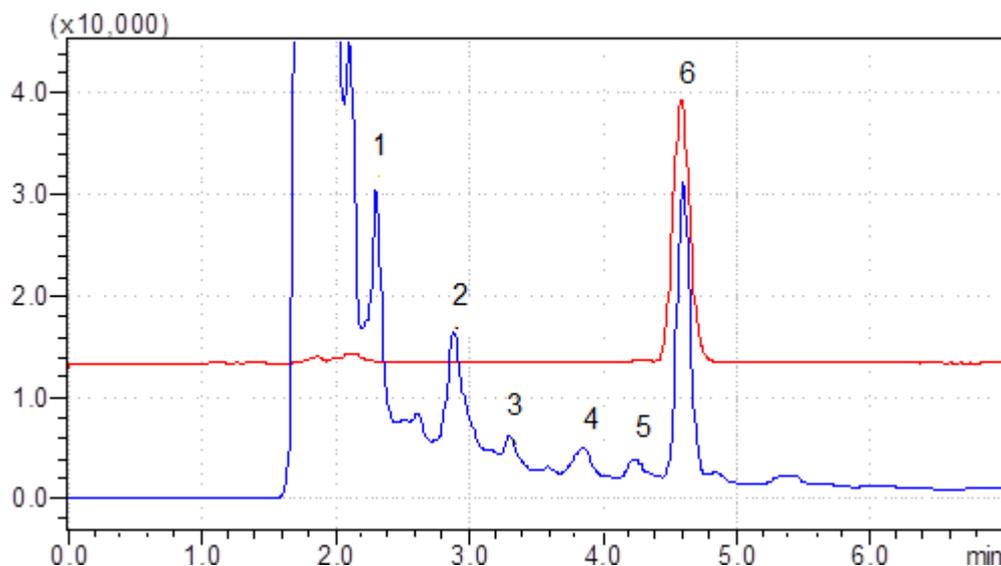


Figure III.3 : Comparaison de chromatogrammes : une solution étalon d' α -tocophérol (haut) et une solution d'huile d'olive (bas). Pics identifiés, 1 à 5 : composés vitamers probables de la vitamine E, 6 : α -tocophérol ($t_r = 4.67$ min).

III.4 ANALYSE QUANTITATIVE

III.4.1 PLAN D'ÉTALONNAGE EXTERNE

Un plan d'étalonnage externe a été établi pour quantifier l' α -tocophérol dans les échantillons d'huile d'olive. Le protocole expérimental consiste à préparer une solution primaire, qui va permettre de délivrer différentes concentrations, nécessaires pour réaliser les essais quantitatifs et qualitatifs. La détermination de la concentration a été réalisée par spectrophotométrie UV.

En premier lieu, un mode (Scan) a été exécuté dans la plage 250 à 350 nm, sur une solution préparée en diluant trois fois de la solution primaire, pour déterminer la longueur d'onde maximale de l' α -tocophérol, comme on le voit bien sur la figure (III. 4), la longueur d'onde maximale de l' α -tocophérol se situe à (292 nm).

En deuxième lieu, d'autres dilutions indépendantes ont été faites pour préparées au total quatre solutions d'étalonnage.

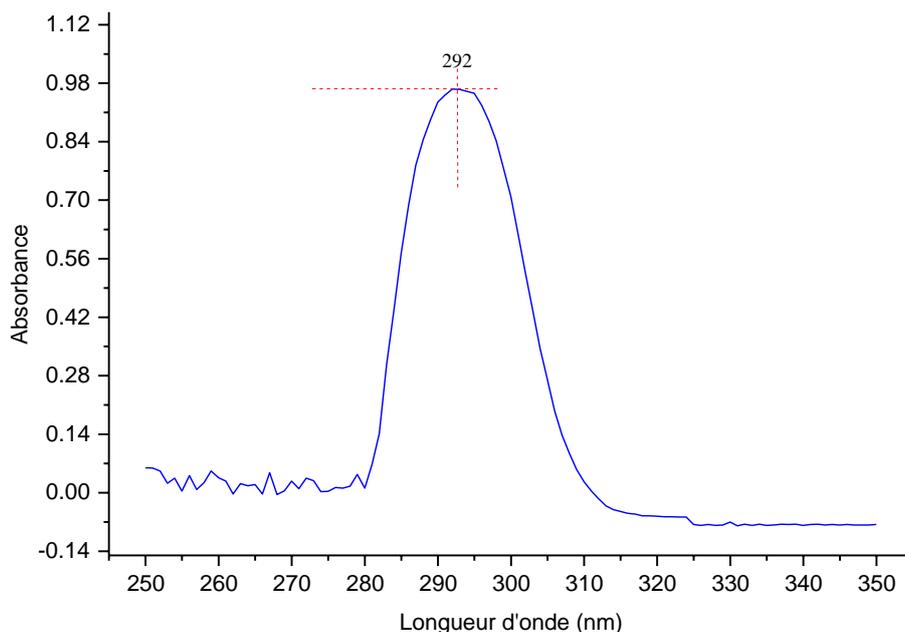


Figure III. 4 : Spectre d'absorption UV caractéristique de l'α-tocophérol.

III.4.2.PREPARATION DES SOLUTIONS ETALONS POUR TRACER LA DROITE D'ETALONNAGE

Le calcul de la concentration de la solution primaire a été fait sur la base de l'équation de Beer-Lambert et qui doit être par la suite corrigée par le facteur de pureté (d), comme suit :

$$C = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot l} \times d$$

Où

C : Concentration de la solution de l'α-tocophérol

Abs : Absorbance moyenne.

ε : Coefficient d'absorption molaire en (L.mol⁻¹ cm⁻¹).

l: Epaisseur de la cuvette en cm.

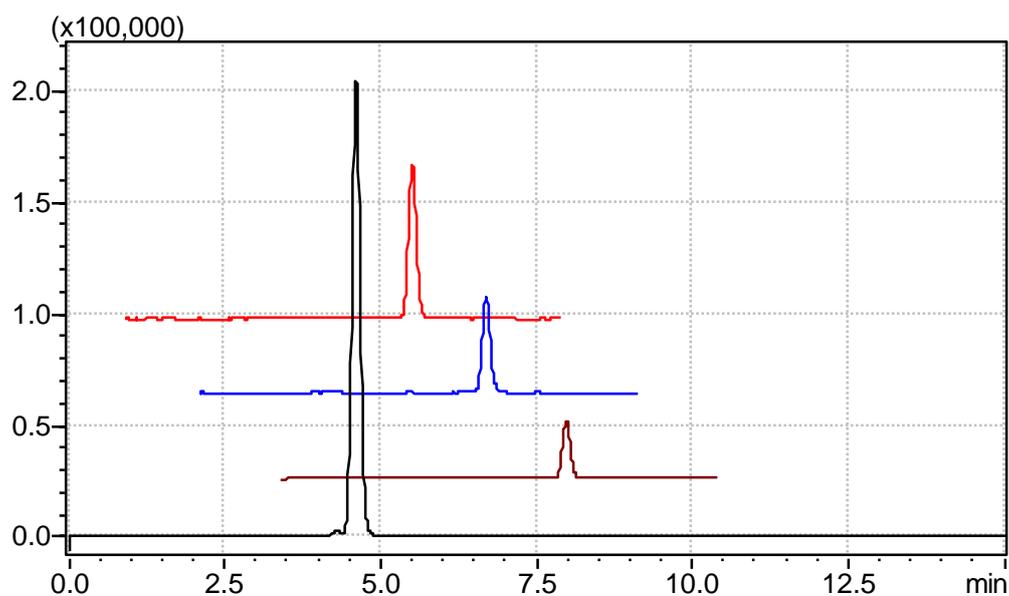
d : Degré de pureté.

La détermination des concentrations des autres solutions étalons a été donnée par la simple règle de dilution, le tableau (III.2) regroupe les valeurs corrigées des concentrations de toutes les solutions étalons.

Tableau III. 2 : Résultats de l'analyse UV et HPLC des solutions étalons de l' α -tocophérol.

Etalon	Absorbance	dilution	C ($\mu\text{mol/L}$)	Aires	Pureté (%)
1		8	36.325	234576	
2		5	58.120	391875	
3		3	96.866	628312	
4	0.966	1	290.599	1864092	98.22

Par contre, l'analyse chromatographique sur les solutions étalons a permis de déterminer, premièrement le degré de pureté sur la solution primaire et deuxièmement de recueillir les données des aires, nécessaires pour tracer la droite d'étalonnage. Les chromatogrammes des quatre solutions étalons sont superposés dans la figure (III.5).

Figure III. 5 : Comparaison des chromatogrammes des différentes solutions étalon de l' α -tocophérol.

En utilisant le logiciel « Origin » on a tracé la droite d'étalonnage externe et déterminé ses différents coefficients, en utilisant les résultats des aires du pic en fonction de la concentration d' α -tocophérol comme indiqué sur la figure (III. 6).

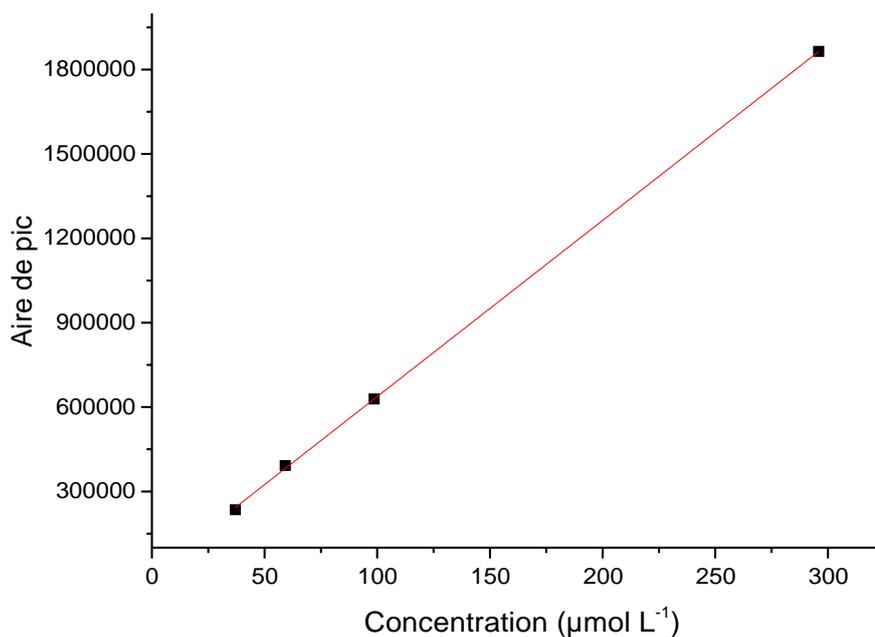


Figure III. 6 : Droite d'étalonnage externe. Equation de la droite ($y = 6377.987 x + 11310.3$)
 $r = 0.9999$, $r^2 = 0.9998$

III.4.3 LINEARITE

Une inspection visuelle sur le graphe de la figure (III.6), montre que les différents niveaux sont distribués linéairement. Un lissage linéaire a été exécuté donc par le logiciel et a permis d'observer une très forte corrélation ($r = 0.9999$).

III.5 DOSAGES DES ECHANTILLONS D'HUILE D'OLIVE

III.5.1 NATURE DES ECHANTILLONS

L'étude a été portée sur 5 échantillons répartis comme suit :

- Deux (2) échantillons de la wilaya de TLEMCEM.
- Un (1) échantillon de la wilaya de Boumerdes.
- Un (1) échantillon de la wilaya de MASCARA.
- Un (1) échantillon de la wilaya de Oum El bouaghi

Les échantillons d'huile d'olive dans un flacon en verre propres et secs d'une taille minimale de 250 ml. Les flacons sont étiquetés et emballer avec le papier aluminium, dans chaque échantillon on indique le code et la région.

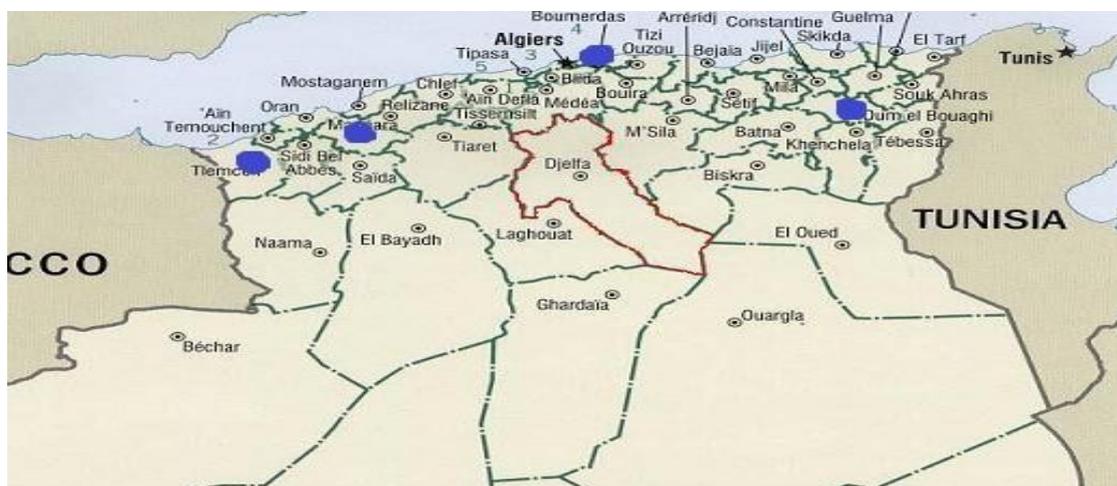


Figure III. 7 : les différentes régions de prélèvement.

Tableau III. 3 : Résultats de l'analyse RP- HPLC des échantillons.

Code	Régions	Localité	Procédés de production	Aire de pic	C ($\mu\text{mol/L}$)
1	Boumerdas	Timazrit	Centrifugation	129194	18.483
2	MASCARA	Sig	Centrifugation	245796	36.765
3	Oum el Bouaghi	Sidi R'Ghiss	Centrifugation	1033239	160.227
4	TLEMEN	Sabra	Centrifugation	591125	90.909
5	TLEMEN	Maghnia	Centrifugation	426878	65.157

III.5.1.1 DISTRIBUTION DES AIRES DES PICS DE L'ALPHA-TOCOPHEROL

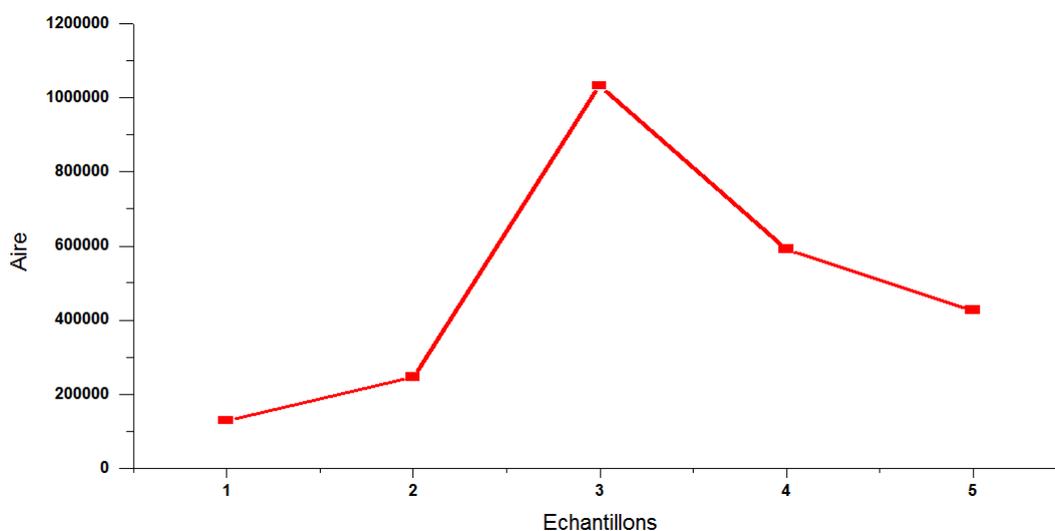


Figure III.8 : Distribution des aires des pics de l' α -tocophérol

III.5.1.2 . Evaluation des teneurs en vitamine E des échantillons analysés

L'huile d'olive provient de la région de Oum El bouaghi renferme la teneur la plus élevée en α -tocophérol avec 163.131214 $\mu\text{mol/l}$, suivie avec la région de Tlemcen (Sabra) avec un taux de 92.5562386 $\mu\text{mol/l}$, ensuite la région de Tlemcen (Maghnia) avec 66.3373719 $\mu\text{mol/l}$, Par ailleurs la région de Mascara (Sig), Boumerdas (Timazrit) se distingues par une faible quantité 37.431122 et 18.8178609 $\mu\text{mol/l}$ respectivement.

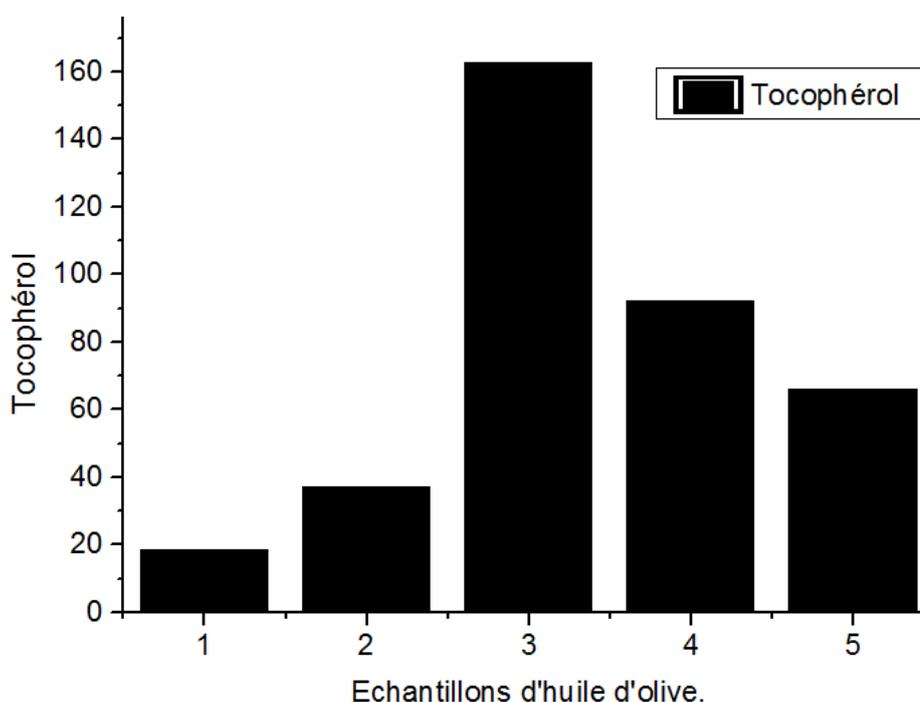


Figure III. 9 : Teneur des tocophérols dans l'huile d'olive selon les différentes régions.

Selon Woollard et Indyk, l' α -tocophérol est la forme la plus courante de la vitamine E et elle a l'activité biologique la plus élevée. Selon Andrikopoulos et al, la perte de tocophérol résulte de raffinage ou l'hydrogénation. L'importance des tocophérols est due à leurs effets antioxydants. Selon Grigoriadou et al. La teneur en tocophérols dépend non seulement du cultivar, origine mais aussi de plusieurs facteurs tels que le transport, le stockage, et la transformations du fruits, les conditions environnementales (précipitations, ensoleillement, etc.). Selon Aguilera et al. La quantité de α - tocophérol diminue dans les premiers stades de la maturation, mais maintient ensuite sa concentration plus ou moins constamment pendant la maturation. Le contenu de β -tocophérol suivre la même tendance que l' α -tocophérol. Mais le γ -tocophérol semble présenter légère augmentation au cours de la maturation[56].

CONCLUSION

CONCLUSION

La vitamine E est un terme collectif de tocophérols et tocotriénols. Ce sont des antioxydants naturels, La technique rapide et directe de mesure des tocophérols ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$) dans les huiles d'olives a été développée RP-HPLC avec détection UV.

L'objectif de cette étude est de déterminer la teneur la vitamine E dans quelque échantillons d'huiles d'olives sous le thème «**Séparation de vitamers lipophiles dans quelques huiles végétales par chromatographie HPLC**». C'est un sujet de mémoire de Master 2 Post-Graduation en Spectrochimie et Méthodes d'Analyse.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche en Spectrochimie et Pharmacologie Structurale de l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

Le but principale été de déterminer la concentration du l' α -tocophérol des huiles d'olives de déférente origines.

L'extraction de l' α tocophérol se montre efficace par les solvants peu polaire d'huile d'olive, l'acétate d'éthyle qui donne une quantité important de l'air de pic majoritaire, par rapport au autres solvants

Les résultats obtenues par cette étude indiquent que la que la teneur en l' α - tocophérols est plus élevée dans la wilaya de Oum el Bouaghi , suivie par les régions de la wilaya de Tlemcen (Sabra puis Maghnia),, ensuite la wilaya de Mascara et finalement de Boumardas.

Les techniques les plus appropriées dans le domaine de l'analyse suivantes :

- Capillaire électrophorèse (CE), couplé à la spectrométrie de masse (MS).
- La chromatographie en phase gazeuse (GC) –MS.
- La résonance magnétique nucléaire (RMN).
- L'infra rouge (IR).

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

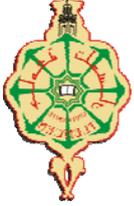
- 1- Alonso-Salces RM, Héberger K, Holland MV, Moreno-Rojas JM, Mariani C, Bellan G, Reniero F, & Guillo C (2010) Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118, 956-965.
- 2- Haddada FM, Manai H, Daoud D, Fernandez X, Lizzani-Cuvelier L, & Zarrouk M (2007) Profiles of volatile compounds from some monovarietal Tunisian virgin olive oils. Comparison with French PDO. *Food Chemistry*, 103, 467-476.
- 3- Kandyli P, Vekiari AS, Kanellaki M, Kamoun NG, Msallem M, & Kourkoutas Y (2011) Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1333-1341.
- 4- Rodgers S, & Young NWG (2008) The Potential Role of Latest Technological Developments Including Industrial Gastronomy in Functional Meal Design. *Journal of Culinary Science & Technology*, 6, 170-187.
- 5- Yamada P, Zarrouk M, Kawasaki K, & Isoda H (2008) Inhibitory effect of various Tunisian olive oils on chemical mediator release and cytokine production by basophilic cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 279-287.
- 6- Christopoulou E, Lazaraki M, Komaitis M, & Kaselimis K (2004) Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. *Food Chemistry*, 84, 463-474.
- 7- Kachouri F, & Hamdi M (2006) Use *Lactobacillus plantarum* in olive oil process and improvement of phenolic compounds content. *Journal of Food Engineering*, 77, 746-752.
- 8- Salvador MD, Aranda F, Gómez-Alonso S, & Fregapane G (2001b) Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry*, 74, 267-274.
- 9- Oi-Kano Y, Kawada 9-T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R. & Iwai. K (2007) Extra virgin olive oil increases uncoupling protein content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 685-692.

- 10- Manai-Djebali H, Krichène D, Ouni Y, Gallardo L, Sánchez J, Osorio E, Daoud D, Guido F, & Zarrouk M (2012) Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, 109-119.
- 11- Kachouri F, & Hamdi M (2004) Enhancement of simple polyphenols in olive oil derived from a OMW fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry*, 39, 841-845.
- 12- D'Imperio M, Dugo G, Alfa M, Mannina L, & Segre AL (2007) Statistical analysis on Sicilian olive oils. *Food Chemistry*, 102, 956-965.
- 13- Drummond L (2010) *Sunday Telegraph* (Australia), October 17, Features; p. 10.
- 14- Criado MN, Morello JR, Motilva MJ, & Romero MP (2004) Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 81, 633-640.
- 15- Mendoza MF, Gordillo CM, Expósito JM, Casas JS, Cano MM, Vertedor DM, & Baltasar MNF (2013) Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chemistry*, 141, 2575–2581.
- 16- Beltran G, Aguilera MP, Del Rio C, Sanchez S, & Martinez L (2005) Influence of ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89, 207-215.
- 17- Gomez-Rico A, Salvador MD, Moriana A, Perez D, Olmedilla N, Ribas F, & Fregapane G (2007) Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. Olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*, 100, 568-578.
- 18- Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercker G, Zarrouk M, & Miled DDB (2008) Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109, 743-754.
- 19- Boskou D (1996) *Olive oil: Chemistry and technology*. Champaign, IL: AOCS Press.
- 20- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, & Lercker G (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12, 1679-1719.
- 21- Scano P. et al. (1999) Recognition and quantitation of cis-vaccenic and eicosenoic fatty acids in olive oils by C-13-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lipids*, 34, 757–759.

- 22- Blekas, G. and Boskou, D. (1998) Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and α -tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil: Effect of acidity. *Grasas Aceites*, 49, 34–37.
- 23- Boskou, D. (1999) Non-nutrient antioxidants and stability of frying oils, in *Frying of Food* (eds D. Boskou and I. Elmadfa) Technomic Publishing Co, Inc., Lancaster, pp. 183–204.
- 24- Psomiadou, E. and Tsimidou, M. (2001) Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 640–647.
- 25- Lo Curto, S., Duco, L., Mondello, L., Errante, G. and Russo, M.T. (2001) Variation in tocopherol content in Italian virgin olive oils. *Ital. J. Food Sci.*, 13, 221–226.
- 26- Boskou, D. (1996) *Olive Oil, Chemistry and Technology*, AOCS Press, Champaign, Illinois.
- 27- Reiter, B. and Lorbeer, E. (2001) Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 881–888.
- 28- Morales, M.T. and Aparicio, R. (1999) Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 76, 295–300.
- 29- Morales, M.T. and Tsimidou, M. (2000) The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality, in *Handbook of Olive Oil* (eds J. Harwood and R. Aparicio), Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, pp. 393–438.
- 30- Guth, H. and Grosch, W. (1991) A comparative study of the potent odorants of different virgin olive oils. *Fat Sci. Technol.*, 93, 335–339.
- 31- Blekas, G., Guth, H. and Grosch, W. (1994) Changes in the levels of olive oil odorants during ripening of the fruits, in *Trends in Flavour Research* (eds H. Maarse and Vander Heij), Elsevier Sciences, Amsterdam, pp. 449–502
- 32- Blekas, G. and Guth, H. (1995) Evaluation and quantification of potent odorants of Greek virgin olive oil; in *Food Flavours: Generation, Analysis and Process Influence* (ed G. Charalambous), Elsevier, Amsterdam, pp. 419–427.
- 33- Blekas, G. and Guth, H. (1995) Evaluation and quantification of potent odorants of Greek virgin olive oil; in *Food Flavours: Generation, Analysis and Process Influence* (ed G. Charalambous), Elsevier, Amsterdam, pp. 419–427.
- 34- Reiners, J. and Grosch, W. (1998) Odorants of virgin olive oils with different flavour profiles. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2754–2763.

- 35- Morales, M.T. and Aparicio, R. (1999) Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 76, 295–300.
- 36- Morales, M.T. and Aparicio, R. (1999) Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 76, 295–300.
- 37- Lercker, G., Frega, N., Bocci, F. and Mozzone, M. (1999) Volatile constituents and oxidative stability of virgin olive oils. Influence of the kneading of olive paste. *Grasas Aceites*, 50, 26–29.
- 38- Morales, M.T. and Aparicio, R. (1999) Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 76, 295–300.
- 39- Di Giovacchino, L. (1996) Olive harvesting and olive oil extraction, in *Olive Oil* (ed D. Boskou), AOCS Press, Champaign, Il, pp. 12–51.
- 40- Caponio, F., Alloggio, V. and Gomes, T. (1999) Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chem.*, 64, 203–209.
- 41- Cert, A. et al. (1999) Influence of extraction methods on the characteristics and minor components of extra virgin olive oil. *Olivae*, 79, 41–50.
- 42- Dr.N.MALLIKARDJUNA RAO.(2013) *Biochemistry questions and Answers*,173.
- 43- Brock Goossens ,Joe Marion.(2011) *Concordia College journal of Analytical Chemistry* 2 ,45.
- 44- Elena A.Serbinova and Lester Packer.(1994) Antioxydant properties of α -tocopherol and α -tocotrinol ,355.
- 45- Ronald Eitenmille, Junsoo Lee.(2004) *Vitamin E Food Chemistry ,Composition,and Analysis*,2-3.
- 46- Amcha Abdelkader .(2012) *Détermination des antioxydants des huiles d'olives (N.W Algérie) .Thèse de Magister*,28-29.
- 47- Francis Rouessac, Annick Rouessak .(2004) *Analyse Chimique Méthodes et techniques instrumentals modernes* ,159-161.
- 48- Gary D.Christian, Pernendu K, Dasgupta, Kevin A. Schug. (2014) *Analytical Chemistry*, 651.
- 49- David Harvey. (2000) *Modern Analytical Chemistry*, 579 ,580.
- 50- Andrea Weston, Phyllis R.Brown. (1997) *HPLC and CE Principles and Practise* ,90.
- 51- Apostolos Konstantinor,Fereidoon Shahidi .(2017) *Olives and Olive Oil as Functional Foods ,Boiactivity ,Chemistry and processing*, 571.
- 52- A.Braithwaite, F.J Smith. (1996) *Chromatographic Methods*, 261-262.

- 53- Cuvelier C; O. Dotreppe et L.Istasse Chimie . (2003) Sources alimentaires et dosage de la vitamine E, Méd. Vét ;147 : 315-324.
- 54- Chekroun Nabila. (2013) Détermination de la capacité antioxydante des huiles végétales : Huile Afia. Thèse de Master ,60.
- 55- R. Laouer. (2009) 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, 49.
- 56- Apostocols Kiristakis ,Fereidoon Shahidi. (2017) Olive and Olive Oil as Functional Foods Bioactivity, Chemistry and Processing ,99.



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEM

Résumé

La chimie de la vitamine E est relativement complexe. Le dosage de la vitamine E dans l'échantillon d'huile d'olive est possible après un traitement de l'échantillon avec un solvant tel que l'acétate d'éthyle. L'identification et la quantification ont été réalisées par une méthode rapide et directe de chromatographie liquide à haute performance à phase inverse RP-HPLC avec détection UV, l'élution est accomplie à 1.5mL/min, avec une phase mobile composée de 60% Méthanol et 40% acétonitrile), le volume d'injection était de 20µl. La détection des tocophérols a été achevée à 292 nm.

Mots clé : vitamine E, chromatographie HPLC, huile d'olive.

Abstract

The chemistry of vitamin E is relatively complex. The dosage of vitamin E in the olive oil sample is possible after treatment of the sample with a solvent such as ethyl acetate. The identification and the quantification were carried out using a rapid and direct method of RP- HPLC reverse phase high performance liquid chromatography with UV detection, the elution is accomplished at 1.5mL / min, with a mobile phase composed of 60% Methanol and 40% acetonitrile), the injection volume was 20µl. The detection of tocopherols monitored at 292 nm.

Keywords: vitamin E, HPLC chromatography, olive oil.

ملخص

كيمياء الفيتامين E معقدة نسبيا. معايرة الفيتامين E في عينة زيت الزيتون ممكنة بعد المعالجة باستخدام مذيب مثل. أسيتات الإيثيل تم إجراء عملية التحديد والقياس باستخدام طريقة سريعة و مباشرة من الفصل الكروماتوجرافي RP-HPLC مع الكشف في المجال فوق البنفسجي، باستخدام التركيب أسيتونيتريل 40 % و 60 % ميثانول ويتدفق 1.5 مل/د، اما الحجم فكان 20 ميكرو لتر وكشف الجزيئات عند طول الموجة 292 نانومتر.

الكلمات المفتاحية : فيتامين (E), الكروماتوغرافيا HPLC, زيت الزيتون