

Reprinted from

Journal of Chromatography, 204 (1981) 377-383

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 13,167

ÉTUDE PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DE LA VARIABILITÉ DES ACIDES GRAS DES GRAINES DE MIL

M. PANSU*, S. TOSTAIN et M. PINTA

Laboratoire de Spectrographie, Orstom, 70-74 Route d'Aulnay, 93140 Bondy (France)

SUMMARY

Gas chromatographic study of variations in the amounts of fatty acids in millet seeds

To investigate new millet hybrids more accurate methods for the analysis of seed components are needed. For example, the study of small variations in amounts of fatty acids requires a better knowledge of sources of errors in their quantitative chromatographic determination. The results of the extraction-transmethylation method used have been verified by saponification and methylation. The resulting variability is not higher than that due to chromatographic determination (0.5%). Precautions to avoid some unexpected errors have been taken. The multivariate analysis of the results, seed by seed, makes it possible to collect those from the same ear. Sterols determined in these seeds cannot be used as biochemical tracers, since their quantities are too low and not sufficiently variable.

INTRODUCTION

La teneur en huile des graines de mil a été estimée à 4-5%. Elle est similaire et même légèrement supérieure (surtout pour l'acide palmitique) à celles du maïs, sorgho et autres céréales³. Si la composition en acides gras de cette huile a été plusieurs fois déterminée, Jellum et Powell¹ ont été les premiers à étudier les variations de composition pour 65 lignées de mil cultivées dans les mêmes conditions. Ils observent des variations importantes entre ces lignées. Les corrélations entre acides sont, cependant, moins fortes que pour le maïs. L'acide stéarique varie le plus. Entre les acides oléiques et linoléiques, les coefficients de corrélation (négatifs) sont les plus importants. Pour une variété donnée, la taille des graines semble introduire des différences significatives dans la composition, notamment pour les acides oléiques et linoléiques. La teneur de ce dernier croît en raison inverse de cette taille.

L'état de mûrissement des graines joue un rôle important dans la composition. Les changements les plus rapides et les plus importants se produisent dans les seize jours après l'anthèse. Ces changements sont plus faibles après 24 jours. Les fractions d'acides palmitiques et linoléiques décroissent avec le mûrissement tandis que les acides stéariques et linoléiques augmentent. La composition varie peu dans les graines mûres, quelle que soit la date de la récolte; les températures durant la maturation n'ont pas d'influence sur la composition de l'huile de ces graines.

Les résultats d'analyses sont affectés par le choix du solvant d'extraction. Les



solvants apolaires extraient surtout les triglycérides (65 à 80 % chez l'avoine), alors que les solvants polaires extraient les lipides polaires liés à l'amidon de l'endosperme.

Notre but est de préciser la fiabilité d'une méthode d'analyse totale des acides gras sur des graines mûres. En effet, l'interprétation des liaisons stochastiques pouvant exister entre les compositions de différentes souches, ne peut avoir de valeur que si l'on est assuré de la totalité de l'extraction et si la variabilité de cette dernière, ainsi que du dosage, sont faibles devant la variabilité des concentrations des divers échantillons.

Cette étude peut donc se diviser en quatre parties.

(1) Choix au laboratoire de la méthode d'extraction et transestérification avec contrôle de la totalité de l'extraction par une saponification suivie d'une méthylation des produits saponifiés.

(2) Étude sur une farine homogène de la variabilité des opérations d'extraction et transestérification, et de la variabilité propre à l'analyse chromatographique; comparaison des variabilités des concentrations relatives et des teneurs absolues lorsque l'on utilise un étalon interne.

(3) Étude de la variabilité entre farines de quelques souches différentes.

(4) Étude de la variabilité entre graines d'une même chandelle, entre graines de plusieurs chandelles d'une même souche, et comparaison avec les graines d'une autre souche.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Extraction et transméthylation

Les graines sont pesées et broyées dans un mortier en pyrex à piston rodé, type VSC, puis transférées dans des fioles Sovirel de 25 ml, à bouchage à vis. Lors des analyses sur une seule graine pesant 10 à 25 mg, il a été vérifié que les pertes, en poids, n'excèdent pas 5 % dans ces opérations. Pour une bonne extraction des lipides polaires et apolaires, nous avons choisi le mélange 2 ml méthanol-2 ml éther de pétrole. L'acide heptadécanoïque utilisé comme étalon interne est dissous dans l'éther de pétrole d'extraction à raison de 1 mg/ml pour les extractions sur 200 mg de farine, ou 0.1 mg/ml pour les extractions sur une seule graine. Après extraction une nuit, la transméthylation est réalisée selon une technique analogue à celle de Jellum et Powell¹, 70°C pendant 5 h, avec du méthanol anhydre à 3 % d'acide sulfurique. Après refroidissement et adjonction d'eau, les esters en solution dans l'éther de pétrole sont séchés et recueillis dans des tubes gradués cylindroconiques à bouchage à vis. Ces tubes, fabriqués selon nos plans, permettent, selon les prises d'essai, de concentrer les solutions sous courant d'azote au volume désiré pour ne pas modifier les conditions chromatographiques. Les extraits peuvent être conservés à -10°C ou injectés directement dans le chromatographe.

Contrôle de la totalité de l'extraction

On effectue une saponification à reflux sur les farines avec de la potasse méthanolique 2 N pendant 2 h. Le mélange réactionnel est amené ensuite en milieu potasse 0.1 N dans le méthanol à 50 % et agité avec de l'éther de pétrole. La phase éther de pétrole contient les insaponifiables. Elle est concentrée pour un dosage des

acidifiée et les acides gras sont extraits à l'éther éthylique. Après évaporation de l'éther, la méthylation est effectuée comme dans la première méthode.

Conditions chromatographiques

Le dosage des stérols est effectué avec une colonne pyrex de 2.10 m à 300°C, remplie de OV-1 à 3 % sur Chromosorb W AW HMDS.

Pour les acides gras, diverses colonnes ont été expérimentées (DEGS sur Chromosorb W, Silar 10C sur Volaspher A2 100-120 mesh) et nous avons obtenu, finalement, les meilleurs résultats avec une colonne inox de 3 m × 2 mm, remplie de 20 % BDS + 2 % H₃PO₄ sur Chromosorb W (80-100 mesh). Cette colonne donne une bonne séparation de tous les acides gras ainsi qu'une plage de séparation entre l'acide palmitoléique et l'acide stéarique permettant d'utiliser l'étalon interne (acide heptadécanoïque), sans interférence avec les autres acides. En outre, le logarithme des distances de rétention des acides gras saturés est rigoureusement proportionnel à leur nombre d'atomes de carbone.

Le chromatographe utilisé est un Girdel 300 avec détection par ionisation de flamme air-hydrogène. Le volume injecté est 1 µl, la sensibilité 64 × 1. Les températures sont respectivement 200°C pour la colonne, 270°C pour l'injecteur et 250°C pour le détecteur, et la pression d'entrée de l'azote gaz vecteur 2 bars.

RÉSULTATS

Intervalles de confiance des résultats d'analyse

L'analyse des stérols sur six variétés fixées montre des teneurs faibles et peu variables pour ces composés. On observe deux pics de faible amplitude. Celui de temps de rétention le plus élevé correspond au β-sitostérol à une teneur d'environ 0.06 %. L'autre pic peut être du stigmastérol ou du campostérol à une teneur d'environ 0.02 %.

L'analyse des acides gras, après saponification, fournit des chromatogrammes analogues à ceux obtenus par l'extraction au mélange méthanol-éther de pétrole et transméthylation. Cette dernière méthode est donc satisfaisante pour l'analyse totale dans les graines et nous avons étudié la variabilité due à l'échantillonnage et au dosage.

Nous avons attaqué, pour cela, un nombre de 12 échantillons (*p*) de 200 mg d'une farine homogène et effectué sur le produit méthylié 4 injections (*n*) par échantillon dans le chromatographe, soit 48 injections (*pn*). Toutes les injections ont été faites au hasard pour éliminer les effets de dérive éventuelle de l'appareil.

Soit pour un acide gras donné: x_{np} , le résultat de chaque injection; \bar{x}_p , les moyennes de chaque échantillon; \bar{x} , la moyenne globale; σ_2^2 , la variance due aux injections; σ_1^2 , la variance due à l'échantillonnage.

La variance de l'échantillonnage est estimée par $S_1^2 = n \sum_p (\bar{x}_p - \bar{x})^2 / (p - 1)$

qui est une estimation de $\sigma_1^2 + n \sigma_2^2$. La variance due au dosage par $S_2^2 = \sum_p \sum_n (x_{np} - \bar{x}_p)^2 / (np - p)$ qui est une estimation de σ_2^2 . La variance globale par $S_t^2 = \sum_{np} (x_{np} - \bar{x})^2 / (np - 1)$.

Le rapport $F = S_1^2 / S_2^2$ permet de définir l'influence de l'échantillonnage. Les résultats sont donnés dans le Tableau I. Chaque ligne de ce tableau comprend deux

TABLEAU I
ETUDE DE LA VARIANCE DES RÉSULTATS

C.R. = Concentration relative; C.T. = concentration totale.

	Acide											
	C _{16:0}		C _{16:1}		C _{18:0}		C _{18:1}		C _{18:2}		C _{18:3}	
	C.R. (%)	C.T.	C.R. (%)	C.T.	C.R. (%)	C.T.	C.R. (%)	C.T.	C.R. (%)	C.T.	C.R. (%)	C.T.
\bar{x}	19.70	0.977	0.56	0.028	5.48	0.272	25.60	1.270	44.72	2.222	2.57	0.128
	19.68	0.981			5.46	0.272	25.56	1.274	44.84	2.235	2.58	0.129
F	4.1	42.7	0.6	1.2	4.1	7.4	10	56.6	4.1	73.3	1.8	6.5
	3.9	20.6			2.0	7.3	3.3	40.7	4.8	35.2	1.0	2.6
σ_1^2	0.010				0.003		0.020	0.001	0.16	0.004	0.001	
	0.008				0.001		0.005		0.023	0.002		
σ_2^2	0.013		0.001		0.004		0.009		0.20		0.005	0.005
	0.012				0.004		0.009		0.024			
σ_3^2	0.022		0.001		0.007		0.027	0.001	0.35	0.004	0.006	
	0.019				0.005		0.014		0.045	0.002	0.005	
$\frac{\sigma_1}{\bar{x}} \%$	0.51	1.8			1.1	1.5	0.55	1.8	0.9	2.7	1.2	5.1
	0.46	1.3			0.5	1.5	0.27	1.4	0.33	1.8		1.15
$\frac{\sigma_2}{\bar{x}} \%$	0.56	0.61	4.3		1.1	1.1	0.35	0.47	1.0	0.6	2.7	3.1
	0.56	0.61			1.1	1.1	0.35	0.47	0.33	0.6		1.5
$\frac{\sigma_3}{\bar{x}} \%$	0.76	1.9	4.3	3.6	1.5	1.8	0.66	1.8	1.3	2.7	3.1	4.7
	0.71	1.4			1.3	1.8	0.47	1.4	0.47	1.8	2.7	3.1

les résultats du bas, après élimination d'un échantillon défectueux (fuite d'un bouchon lors des transméthylations). En ce qui concerne les concentrations relatives, les rapports *F* trouvés sont peu différents de ceux donnés par les tables de Snédécour au niveau de confiance 99% ($F_{11,36} = 2.8$). La variation due à l'échantillonnage est donc du même ordre que celle due aux injections et la variance globale est approximativement la somme des variances. La variance de l'échantillonnage devient toujours la plus faible après élimination de l'échantillon défectueux dont la cause d'erreur est toujours détectable. Par contre, pour les concentrations totales, cette variance est toujours forte devant celle des injections. L'élimination de l'échantillon défectueux dans ce cas provoque une diminution de l'erreur d'échantillonnage moins importante que précédemment. Celle-ci reste toujours analogue à l'erreur globale tandis que les variations entre injections sont beaucoup plus faibles et analogues aux variations précédentes. Ces considérations montrent que l'erreur d'échantillonnage, dans l'analyse des teneurs totales, semble provenir exclusivement des variations, entre échantillons, du pic étalon interne. Ce dernier a été prélevé dans la même solution-mère, avec une même pipette de 2 ml au 1/20ème pour chaque échantillon. Cependant, l'erreur due au pipetage semble prépondérante par rapport à l'ensemble des autres erreurs.

A partir des résultats précédents, les coefficients de variation, de part et d'autre des moyennes, sont calculés au niveau de confiance 95% par $\sigma_{0,975}/\bar{x}\sqrt{m}$ afin de choisir le nombre d'attaques *p* et de dosages *n* nécessaires pour la précision désirée

ultérieurement. On indique dans le Tableau II la valeur la plus grande de la variation: échantillonnage (1), injection (2) ou globale (3). Les valeurs de *t* des tables de Student sont respectivement 2.228 pour l'échantillonnage, 2.036 pour les injections, 2.021 pour la variation globale, et les valeurs de *m* respectivement: le nombre d'attaques, le nombre d'injections par attaque, le nombre total d'analyse.

TABLEAU II

ERREUR DE PRÉCISION EN VALEUR RELATIVE

La source de variation la plus grande est indiquée: (1), échantillonnage; (2), injection; (3), globale.

p n Acide	C _{16:0}		C _{16:1}		C _{18:0}		C _{18:1}		C _{18:2}		C _{18:3}		C _{20:0}	
	C.R.	C.T.	C.R.	C.T.	C.R.	C.T.	C.R.	C.T.	C.R.	C.T.	C.R.	C.T.	C.R.	C.T.
	(%)		(%)		(%)		(%)		(%)		(%)		(%)	
1 1	1.4	2.9	8.7	7.2	2.5	3.7	0.9	3.1	0.9	4.0	6	6.3	11	12
	(3)	(1)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(1)	(3)	(1)	(3)	(2)	(3)	(3)
1 2	1.0	2.9	6.1	5.1	1.8	3.3	0.6	3.1	0.8	4.0	4.3	4.5	8	8.8
	(1)	(1)	(3)	(3)	(3)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(3)	(2)	(3)	(3)
1 3	1.0	2.9	5.0	4.2	1.4	3.3	0.6	3.1	0.8	4.0	3.5	3.6	6.5	7.2
	(1)	(1)	(3)	(3)	(3)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(3)	(3)	(3)	(3)
2 2	0.8	2.0	4.2	3.6	1.6	2.3	0.5	2.2	0.5	2.8	3.0	3.6	5.5	6.2
	(2)	(1)	(3)	(3)	(2)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)	(3)	(2)	(3)	(3)
2 3	0.8	2.0	3.5	2.9	1.3	2.3	0.4	2.2	0.5	2.8	2.3	3.6	4.6	5.1
	(1)	(1)			(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(3)	(2)		(3)

Avec une attaque et deux injections, la précision sur les teneurs relatives des acides gras les plus concentrés est inférieure à 1%. Elle est suffisante pour observer des variations entre échantillons qui sont égales ou supérieures à 10%, avec quelques réserves pour les deux pics les plus faibles: palmitoléique et arachidique. Les échantillons où se produira une fuite durant l'attaque devront être éliminés.

La mesure des teneurs totales pourra être rendue plus fiable en améliorant la précision du prélèvement de l'étalon interne (seringue, pipette automatique, etc.). La farine de référence, les extraits et les chromatogrammes de l'étude statistique sont conservés pour des contrôles de fidélité. Lors des analyses ultérieures, il pourra être nécessaire de modifier légèrement la pression d'entrée du gaz vecteur pour obtenir des temps de rétention identiques et assurer une bonne reproductibilité des mesures. Pour la même raison, on évitera de changer le volume injecté et l'atténuation. Il est préférable de diluer ou de concentrer les extraits sous courant d'azote.

Variabilité observée entre farines de plusieurs origines fixées génétiquement

Huit variétés fixées cultivées en serre mais dans des conditions différentes ont été analysées. Les teneurs totales varient de 4.8 à 7.6% du poids de farine. Les écarts extrêmes entre les teneurs relatives sont résumés dans le Tableau III, en comparaison avec Jellum et Powell¹ pour 65 lignées de mil et De la Roche *et al.*² pour neuf lignées d'avoine.

TABLEAU III

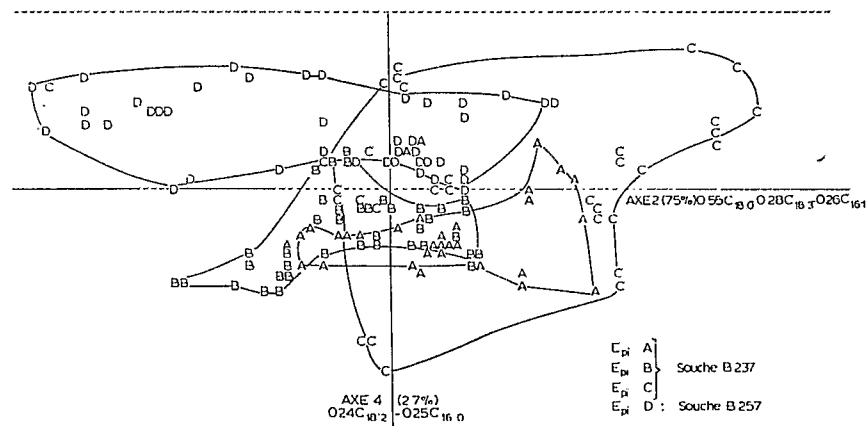
ÉCARTS EXTRÊMES ENTRE LES TENEURS RELATIVES EN COMPARAISON AVEC CEUX DE JELLUM ET POWELL¹ ET DE LA ROCHE *et al.*²

Acides	Huit lignées de mil (%)	Soixante-cinq lignées de mil (%)	Neuf lignées d'avoine (%)
Acide palmitique	19.6-23.4	16.7-25.0	17.2-23.6
Acide palmitoléique	0.4- 0.8	0.3- 0.8	—
Acide stéarique	2.6- 5.5	1.8- 8.0	0.8- 7.8
Acide oléique	22.1-32.1	20.2-30.6	26.5-47.5
Acide linoléique	38.9-48.4	40.3-51.7	33.2-42.2
Acide linoléinique	2.2- 4.0	2.3- 5.8	0.9- 2.4

Comme Jellum et Powell, nous observons une forte corrélation négative entre les teneurs relatives des acides oléique et linoléique. Pour les autres acides, les corrélations entre ces teneurs ne semblent pas significatives. Une augmentation de la teneur totale en acides gras se traduit par une augmentation de celle des acides palmitique, oléique, linoléique et linoléinique. Une augmentation de la quantité de chacun de ces trois derniers acides entraîne une augmentation de celle de l'acide palmitique. Ces résultats restent à confirmer sur un plus grand nombre de lignées, dans des conditions de culture identiques.

Variabilité observée entre graines d'un même pied mère entre différents pieds mères

Nous avons dosé des graines de quatre faux épis d'origine Malienne. Sur chaque chandelle, seize graines ont été analysées⁴. Trois chandelles (A, B, C) provenaient d'une même souche B 237 et une chandelle d'une autre souche B 257. L'analyse en composantes principales des sept caractères (six acides gras et poids de chaque graine) montre qu'il est possible de regrouper les graines d'un même épis et de séparer des épis d'origine différente (Fig. 1). L'axe 1, de plus grande variabilité, représente la somme des acides gras; les autres axes de variabilités importante sont des combi-



naisons des acides gras les moins corrélés. Une augmentation du poids de graine correspond à une diminution de teneurs. Ces résultats intéressants restent à confirmer sur des variétés cultivées dans les mêmes conditions. Des comparaisons entre croisements et parents seraient souhaitables.

CONCLUSION

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode précise et reproductible, très utile pour l'observation de variations de faible amplitude comme les teneurs en acides gras des graines de mil. La méthode d'extraction et transméthylation utilisée permet le dosage de la totalité de ces acides. En tenant compte des précautions indiquées, au niveau de confiance 95% avec une seule extraction et deux injections, la précision sur les teneurs relatives des acides gras les plus concentrés est inférieure à 1%; la précision sur les teneurs absolues qui peut être améliorée est inférieure à 4%.

Les extraits et chromatogrammes témoins de l'étude de variabilité permettent d'assurer une bonne fidélité des analyses.

Les premiers résultats de comparaison entre souches, graines et épis sont encourageants, l'analyse multivariée semblant permettre de regrouper les graines d'un épis déterminé.

Les analyses doivent être poursuivies sur des souches fixées, cette fois obtenues en serre, dans les mêmes conditions de culture, et utilisées, par ailleurs, dans d'autres études génétiques. Enfin, l'analyse séparée des acides gras des triglycérides et phospholipides peut permettre d'aller plus loin dans l'étude du caractère, bien qu'il soit difficile d'obtenir une séparation de ces lipides du même ordre de précision que la chromatographie gazeuse.

RÉSUMÉ

La recherche de nouveaux hybrides de mil nécessite une précision accrue des méthodes d'analyse des constituants des graines.

Ainsi, lors de la détermination chromatographique des teneurs en acides gras, l'observation des faibles variations entre les graines nécessite une meilleure connaissance des sources d'erreurs. Les résultats de la méthode d'extraction et transméthylation choisie ont été contrôlés par saponification et méthylation. La variabilité obtenue n'excède pas celle due à la méthode chromatographique (0.5%). Les précautions à prendre pour éviter certaines erreurs accidentelles ont été déterminées.

Avec cette méthode bien calibrée, l'analyse multivariée des résultats, graine par graine, permet de rassembler celles appartenant à un même épis. Les stérols dosés dans ces graines sont en quantités trop faibles et trop peu variables pour servir de marqueurs biochimiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. D. Jellum et J. B. Powell, *Agron. J.*, 63 (1971) 29-33.
- 2 A. de la Roche, V. D. Burrows et R. I. H. McKenzie, *Crop Sci.*, 17 (1977) 145-148.
- 3 G. W. Burton, Wallace et K. O. Rachie, *Crop Sci.*, 12 (1972) 187-188.
- 4 M. D. Jellum, *Crop Sci.*, 7 (1967) 593-595.