

L'analyse quantitative de lipides par HPTLC, est-elle possible?

L'exemple des monoacylglycerides en EMAG-biodiesel

J. Vela^{1,2}, L. Membrado¹, M.P. Lapieza¹, V.L. Cebolla¹

¹ Instituto de Carboquímica, CSIC; ² Universidad de Zaragoza, Spain

Introduction

quelles informations quantitatives pouvons-nous obtenir en séparant les mélanges de lipides en classes, et à partir des spectres de masse?

Exemple des MG en biodiesel EMAG

carburant renouvelable composé d'esters méthyliques des acides gras, substitut total ou partiel du diésel.

Transesterification catalytique avec un alcool

Qualité EMAG

Nature des lipides source (huiles végétales, graisses animales, etc.)

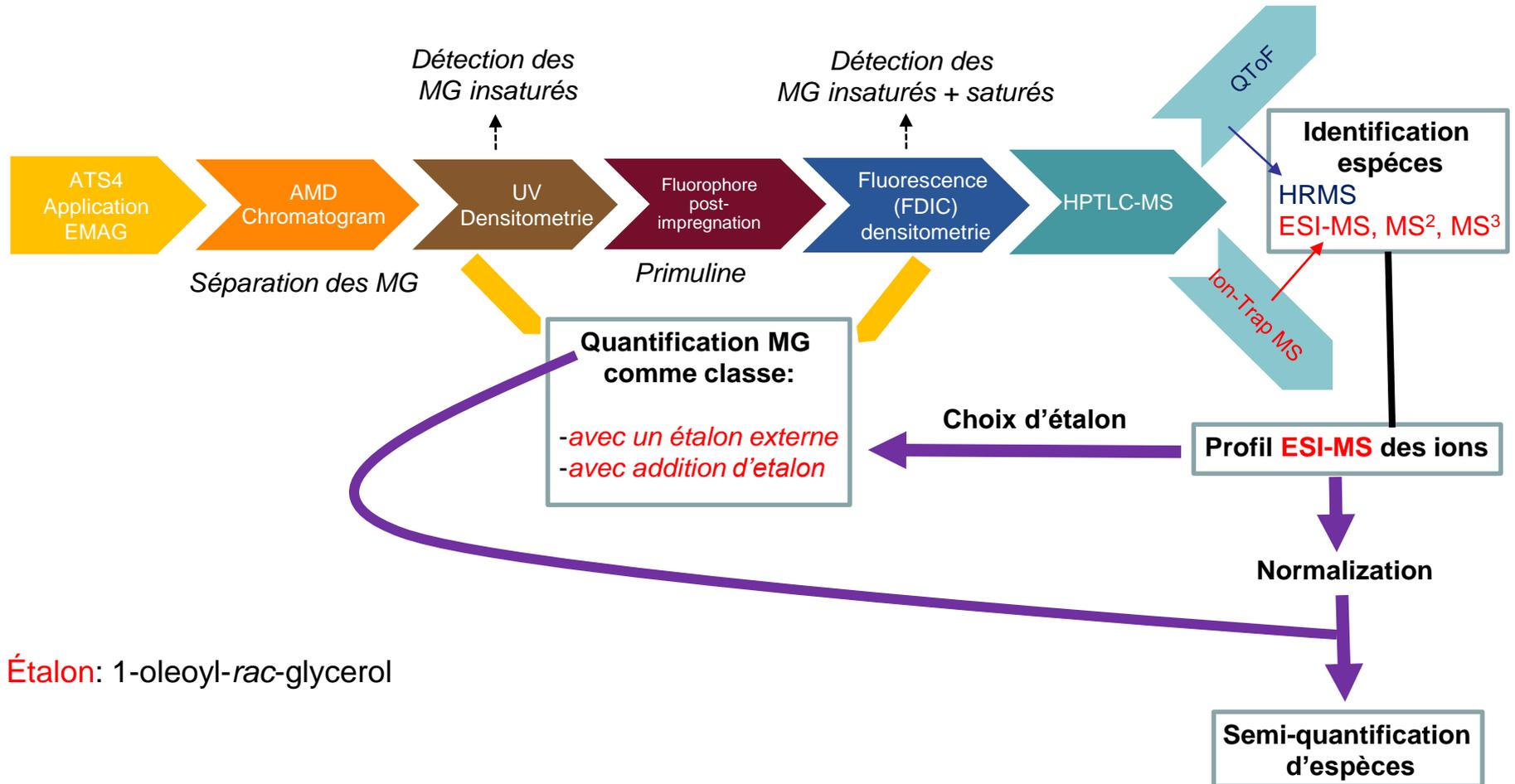
EMAG < 98% conditions de réaction inappropriées

Les impuretés lipidiques (MG, DG, TG, acides gras..) affectent la performance du biodiesel EMAG dans les moteurs

MG peuvent produire obstruction dans les filtres à carburant

Tolérance maximale aux MG: 0.7 wt% (UNE EN14214:2013)

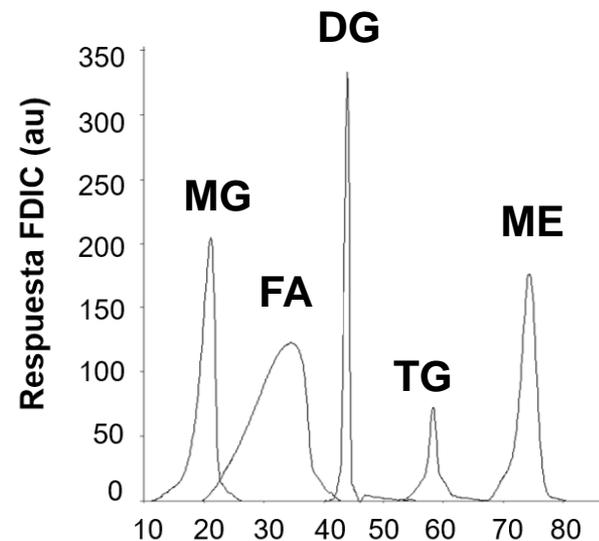
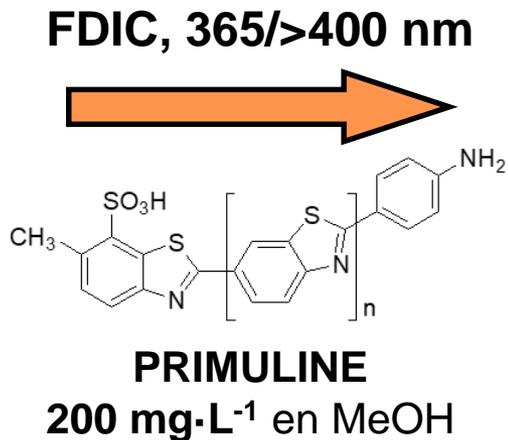
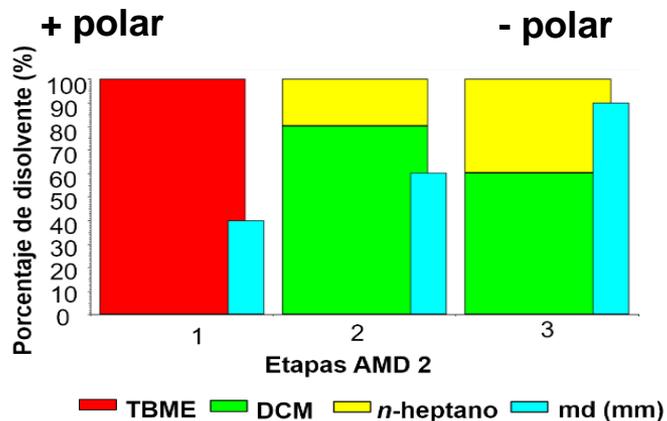
Caractérisation des Monoacylglycerides (MG) des biodiesel type EMAG



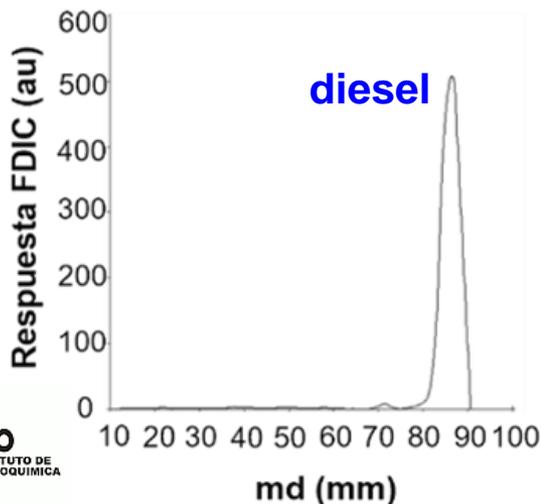
Étalon: 1-oleoyl-rac-glycerol

Séparation et détection des MG d'un biodiesel EMAG

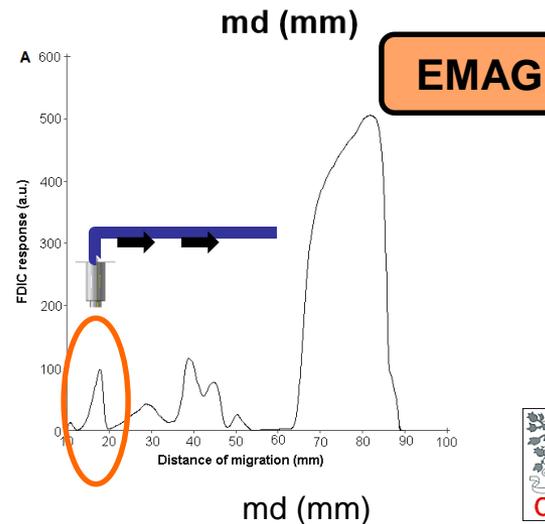
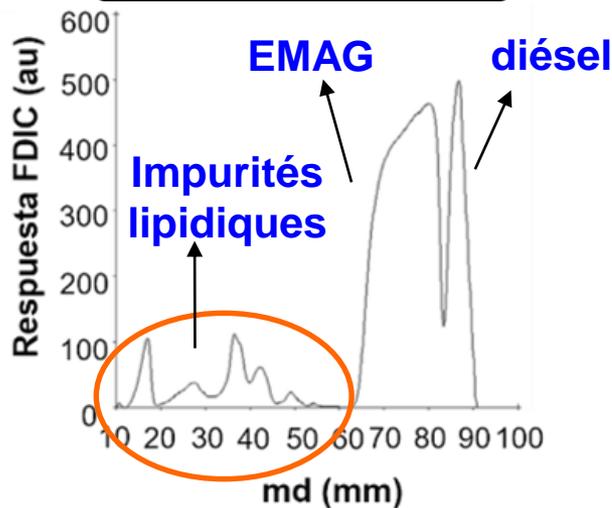
➤ Pas de traitement d'échantillon, pur EMAG



Diesel pur



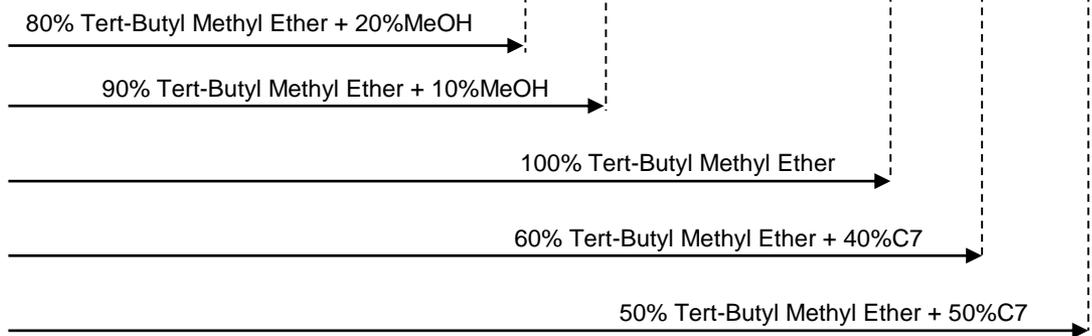
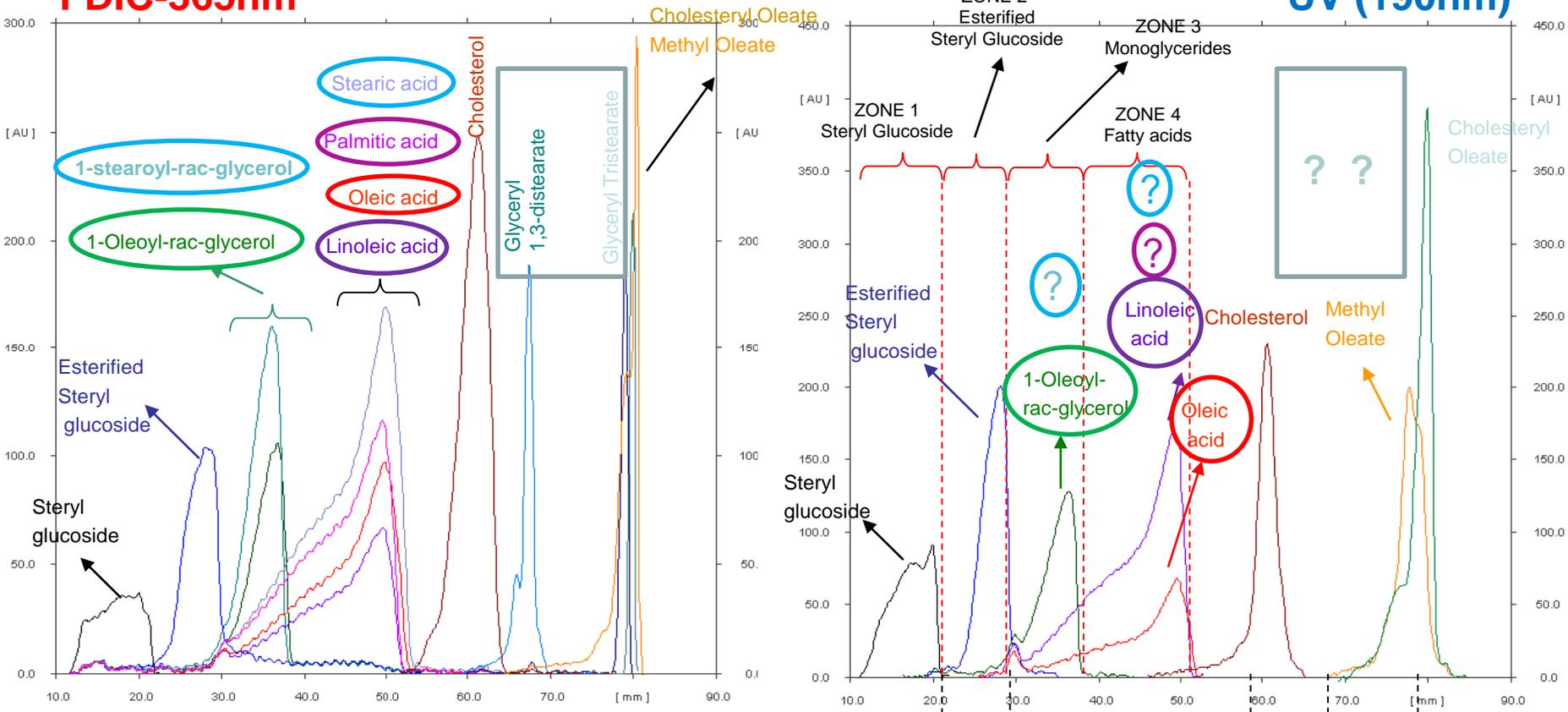
EMAG-diesel 50%



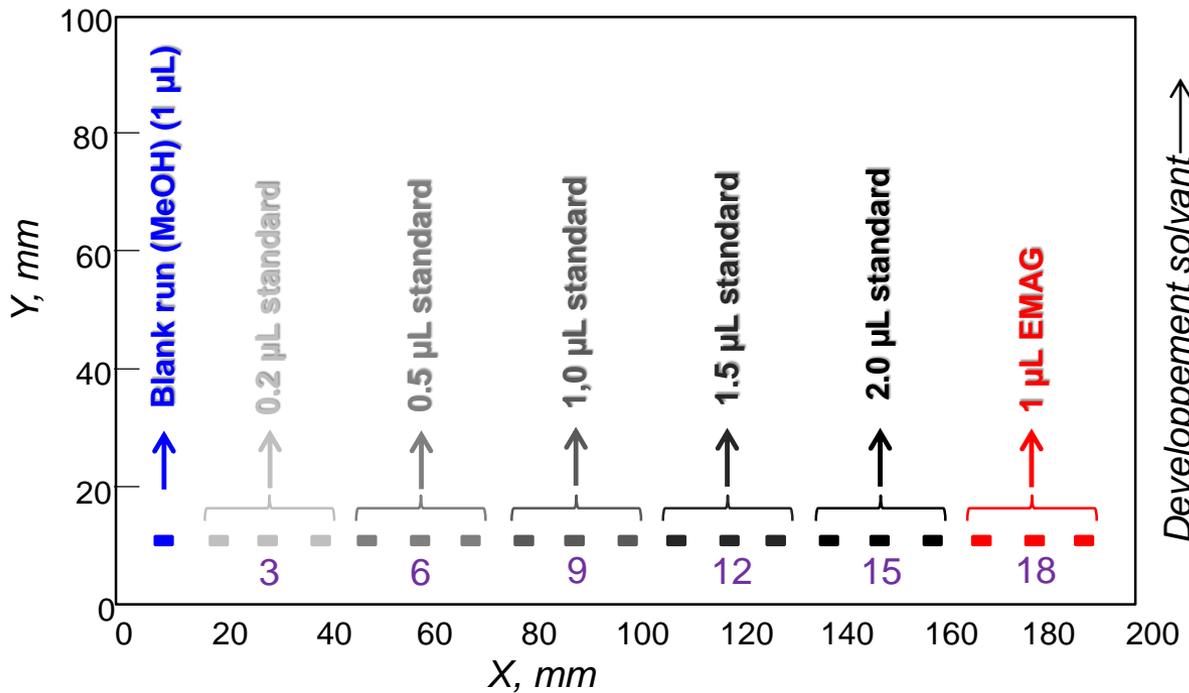
Détection UV versus FDIC

FDIC-365nm

UV (190nm)



Étalonnage Externe de MG: UV and FDIC-primuline

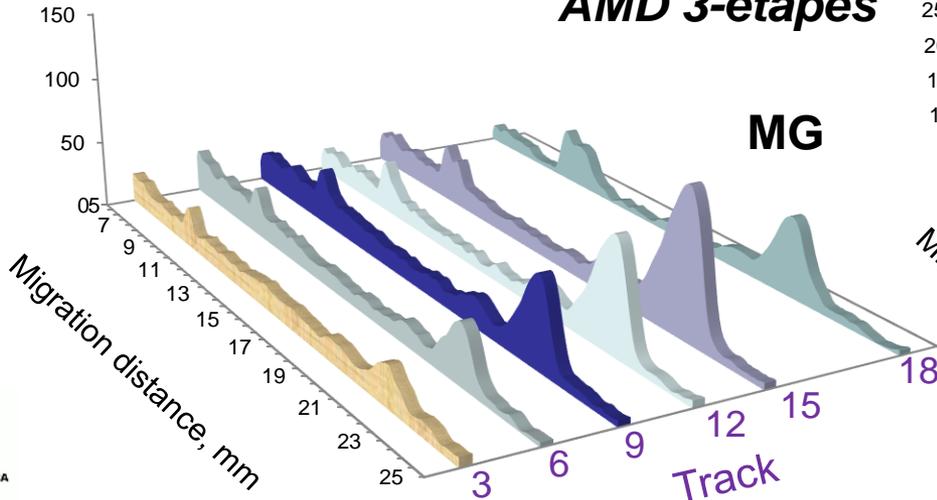


Bandes: 4 mm
 19 tracks

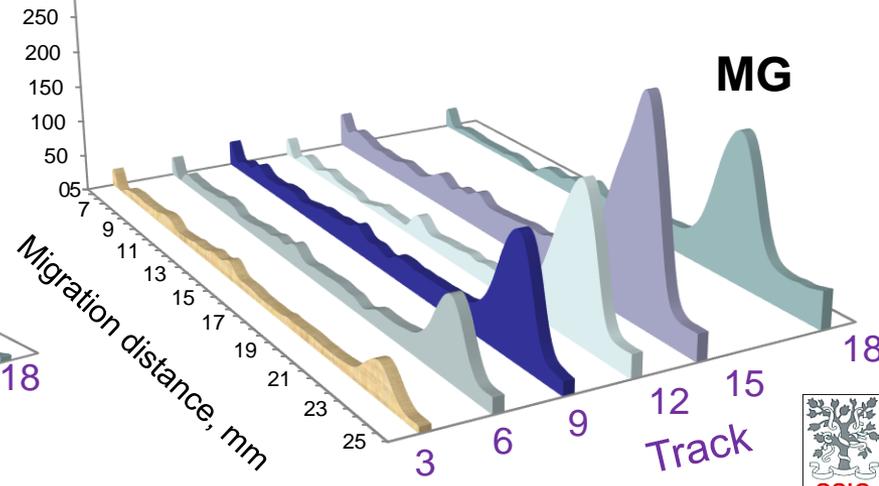
Standard: 1-Oleoyl-rac-Glycerol,
 0,978 mg · mL⁻¹ (en MeOH)

Échantillon: pure EMAG

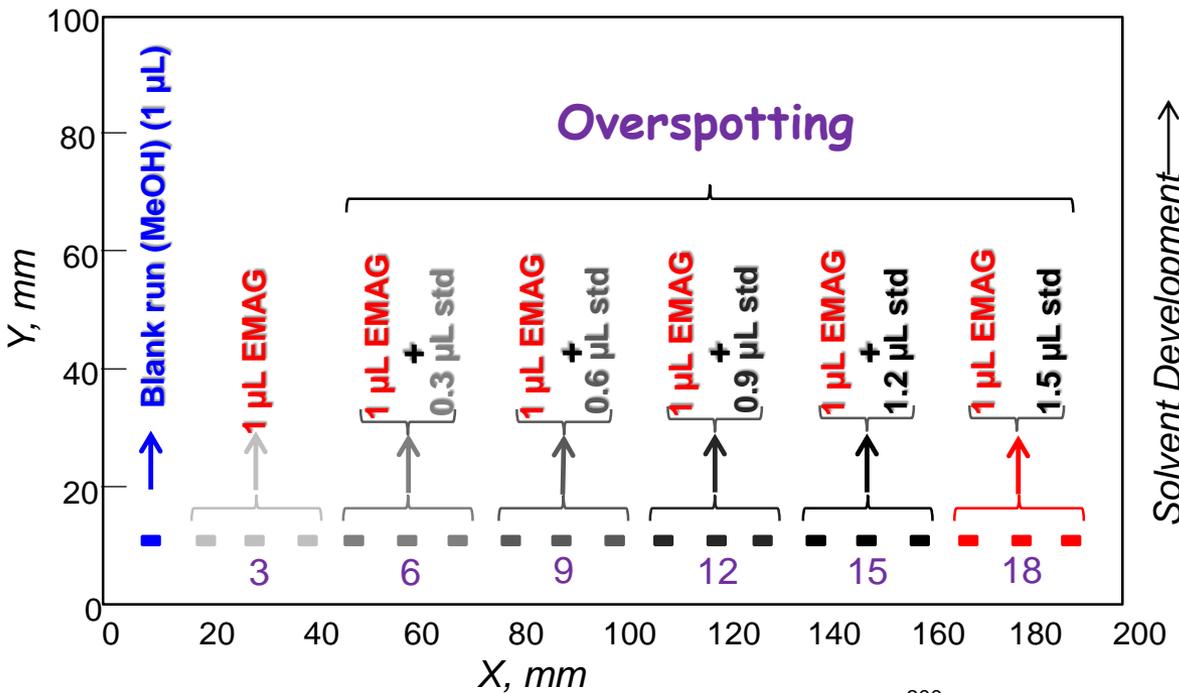
UV 190 nm



FDIC-Primuline



Étalonnage par addition standard of MG: UV et FDIC-primuline

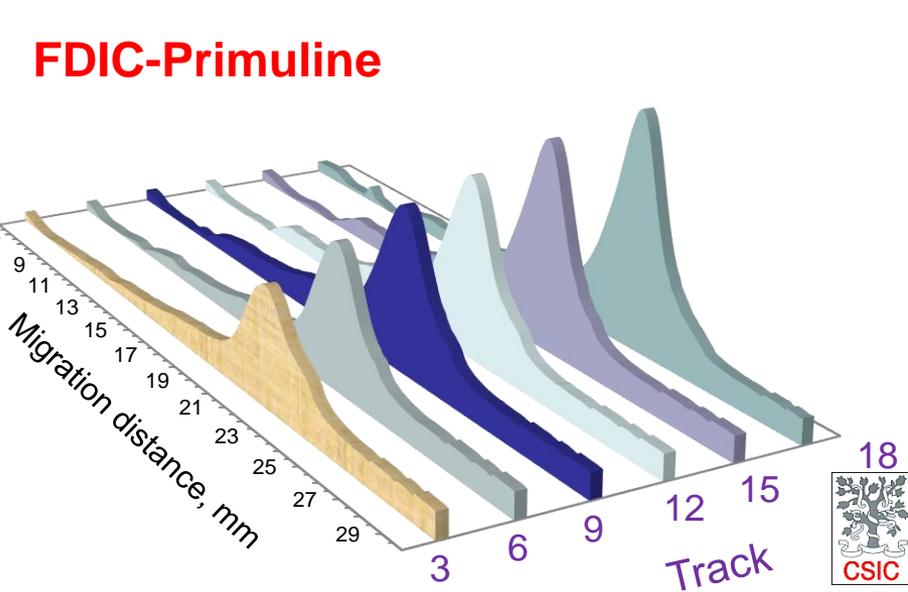
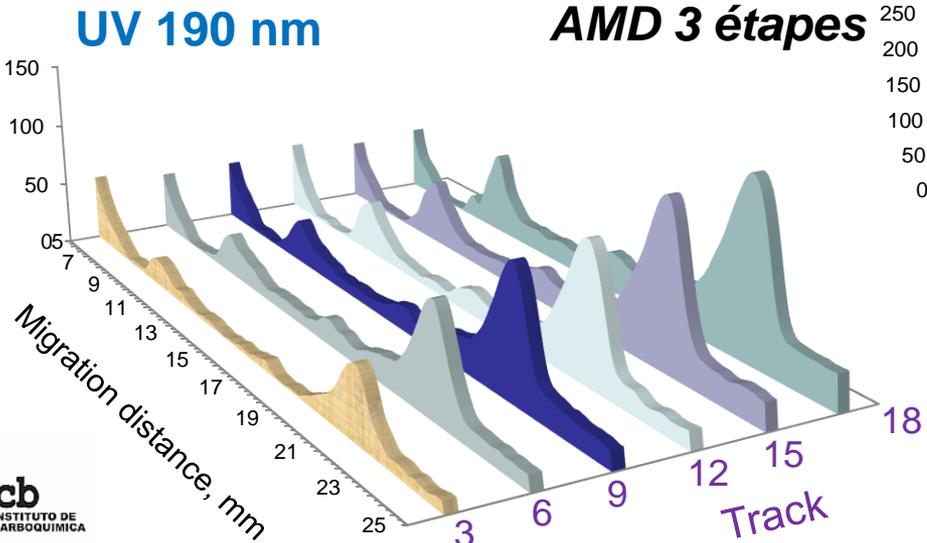


Bandes: 4 mm

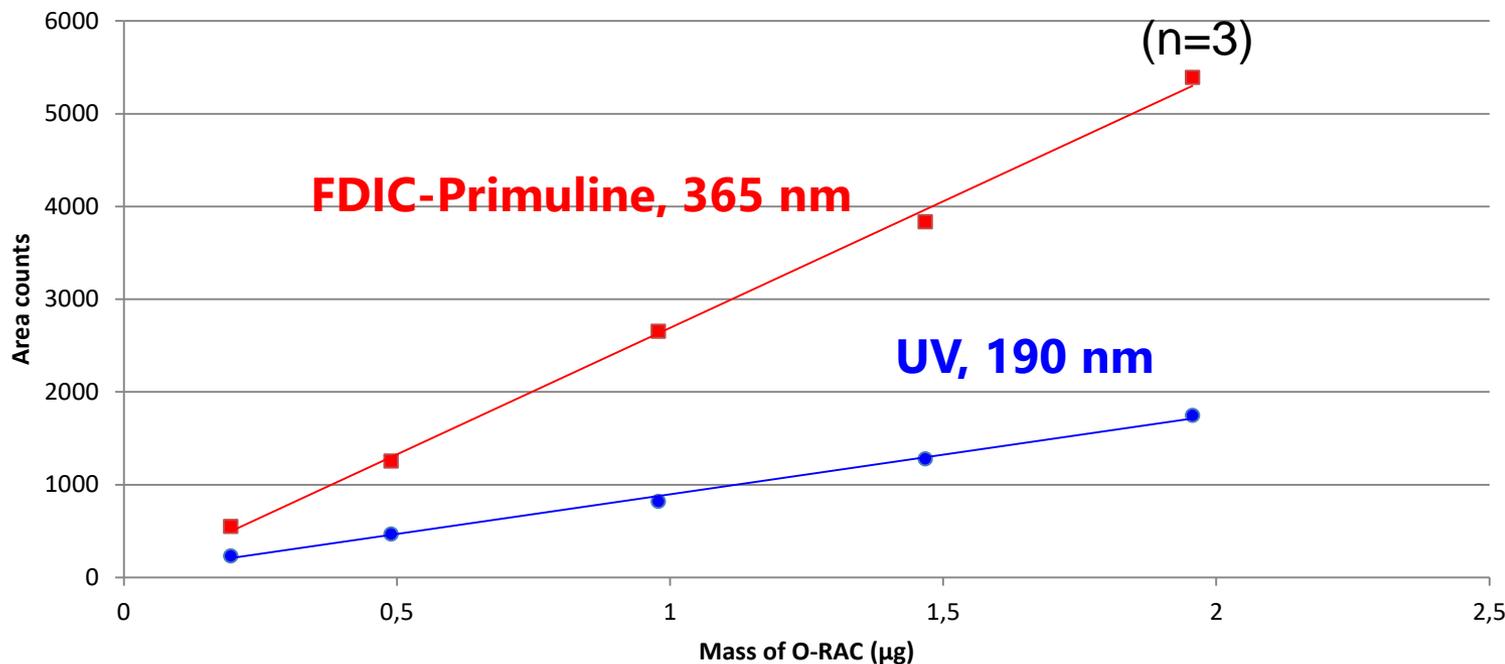
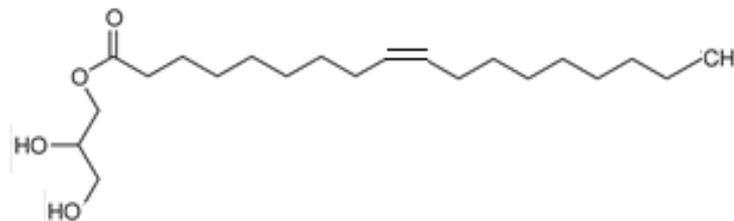
19 tracks

Standard: 1-Oleoyl-rac-Glycerol, 0,978 mg · mL⁻¹ (en MeOH)

Échantillon: pur EMAG



Étalonnage externe



UV190
(n=5)
RSD% 6.9 (EMAG)
RSD% 8.2 (étalon)

FDIC 365/>400 nm
(n=5)
RSD% 5.2 (EMAG)
RSD% 7.3 (étalon)

Ultraviolet, 190 nm

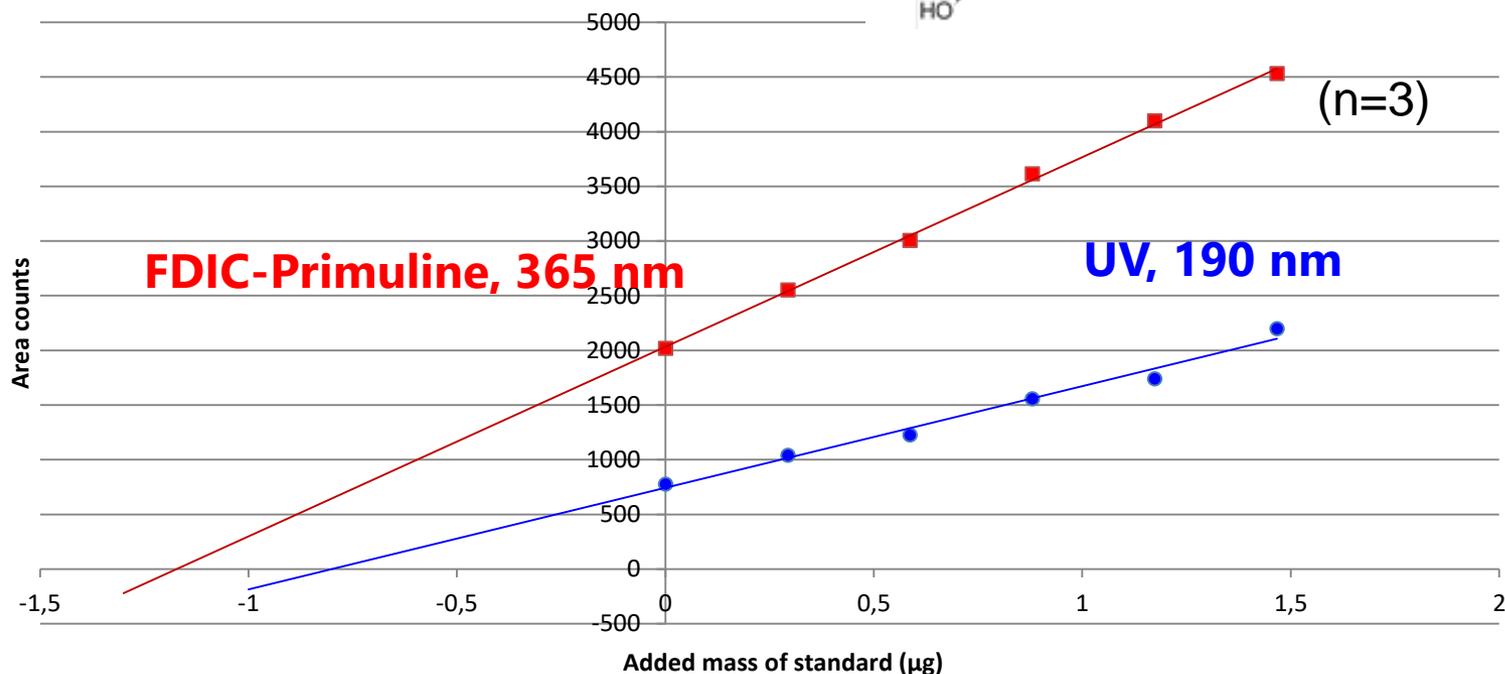
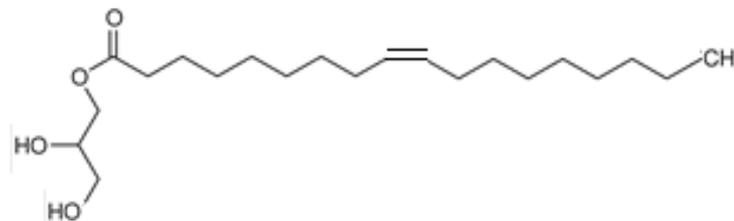
| | | Incertitude | ±tS (95%) |
|--------------------|--------|------------------------------------|--------------------|
| Pente | 856,5 | 29,6 | 94,3 |
| O. Origine | 38,8 | 35,6 | 113,2 |
| Coef. Repr. | 0,9982 | | |
| Valeur | 778,0 | 0,86 | 0,04 |
| | | Conc (µg · µL⁻¹) | Incertitude |

FDIC-Primuline, 365 nm

| | | Incertitude | ±tS (95%) |
|--------------------|-----------|------------------------------------|--------------------|
| Pente | 2730 | 70,4 | 224,1 |
| O. Origine | -40,1 | 84,6 | 269,2 |
| Coef. Repr. | 0,9990038 | | |
| Valeur | 3360,7 | 1,25 | 0,03 |
| | | Conc (µg · µL⁻¹) | Incertitude |

RSD% écart-type relatif; et incertitude comme $(\sigma_{n-1} / n)^{1/2}$

Étalonnage par addition standard



Ultraviolet, 190 nm

| | Pente | O. Origine | Coef. corrl | Incertitude | $\pm tS$ (95%) |
|--|-------|------------|-------------|-------------|----------------|
| | 928,8 | 742,8 | 0,9914 | 61,1 | 169,5 |

Conc ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
0,80

Incertitude
0,11

Valeur

FDIC-Primuline, 365 nm

| | Pente | O. Origine | Coef. corrl | Incertitude | $\pm tS$ (95%) |
|--|-------|------------|-------------|-------------|----------------|
| | 1733 | 2032 | 0,9990 | 37,2 | 103,3 |

Conc ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
1,17

Incertitude
0,04

Valeur

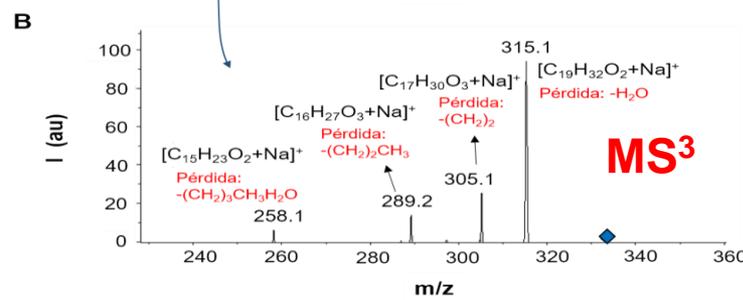
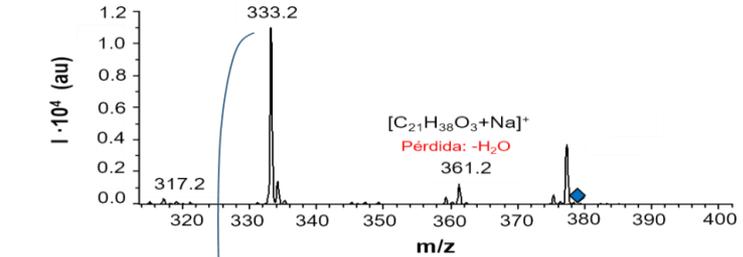
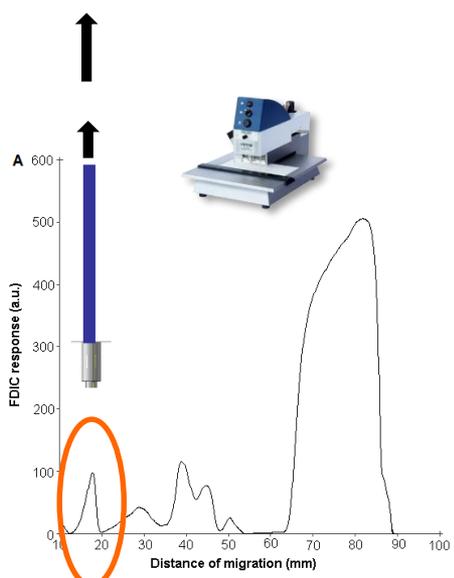
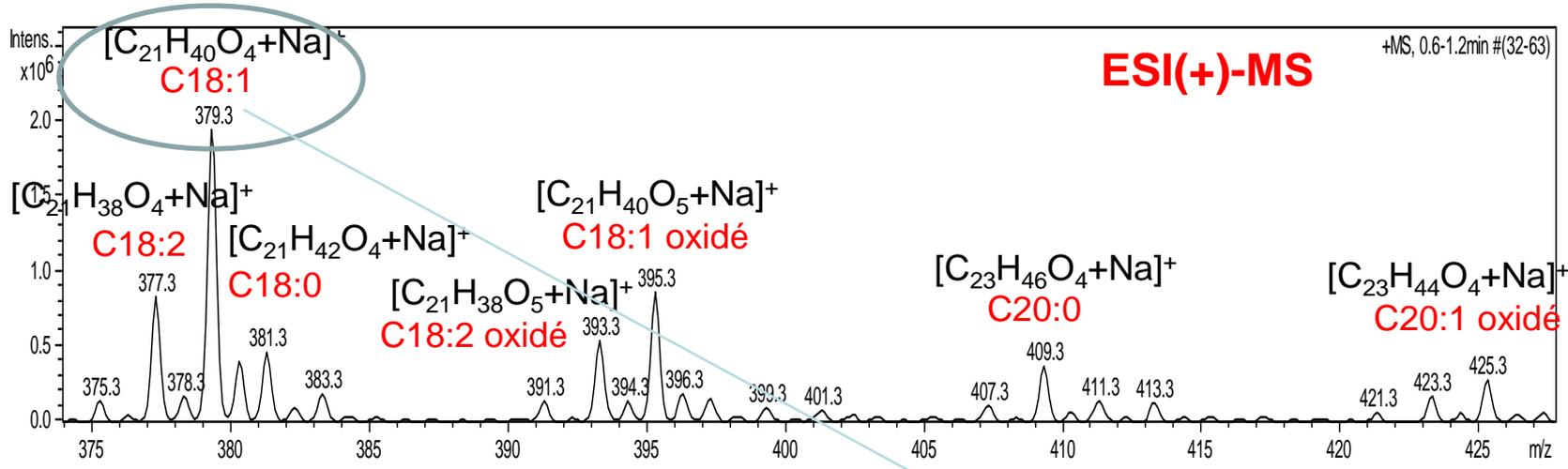
Quantification en moyenne de la classe MG d'un EMAG par densitometrie

| | <u>External standard</u> | ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) | | <u>Standard addition</u> |
|------|--------------------------|--|------|--------------------------|
| UV | 0.86 ± 0.04 | ↔ | UV | 0.80 ± 0.11 |
| FDIC | 1.25 ± 0.03 | ↔ | FDIC | 1.17 ± 0.04 |

- ✓ Des résultats cohérents entre les deux méthodes d'étalonnage pour chaque technique de détection
- ✓ **UV**: dosage des MG insaturés. **FDIC**: dosage des MG saturés + insaturés (hypothèse vraisemblable)
- ✓ On obtient des pourcentages quantitatives en moyenne, car ils dépendent de l'étalon
- ✓ Nous pouvons choisir un étalon représentatif à partir de l'identification MS

*Maximum MG tolerance en EMAG: 0.7 wt% (UNE EN14214:2013).
Cette EMAG a 0.1 wt% in MG. Méthode de control.*

Profil des MG en EMAG par ESI(+)-MS, e identification par MS/MS et MS³ (ion-trap)



Les spectres ESI (+)-MS présentent des profils représentatifs d'espèces moléculaires individuelles MG dans un EMAG

i) les efficacités d'ionisation sont similaires pour les espèces moléculaires appartenant à une classe donnée de lipides*, par exemple, les MG;

ii) En HPTLC, le solvant-gradient de développement est évaporé avant la détection;

iii) le solvant d'élution de l'interface (MeOH) a une composition constante et, de cette manière, des efficacités d'ionisation similaires sont obtenues pour les lipides individuels d'une classe.

* Han X. *Lipidomics: Comprehensive mass spectrometry of lipids*. Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 2016

Normalization des ions de la classe MG et analyse semiquantitative des espèces moléculaires par densitometrie

| <i>m/z</i> | | | % | C ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) |
|------------|--|-------------|----|---------------------------------------|
| 377.3 | $[\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_4+\text{Na}]^+$ | C18:2 | 16 | 0.19 |
| 379.3 | $[\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4+\text{Na}]^+$ | C18:1 | 35 | 0.43 |
| 381.3 | $[\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_4+\text{Na}]^+$ | C18:0 | 8 | 0.10 |
| 393.3 | $[\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_5+\text{Na}]^+$ | C18:2 oxidé | 10 | 0.12 |
| 395.3 | $[\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_5+\text{Na}]^+$ | C18:1 oxidé | 15 | 0.18 |
| 409.3 | $[\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_4+\text{Na}]^+$ | C20:0 | 7 | 0.01 |
| 425.3 | $[\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_4+\text{Na}]^+$ | C20:1 oxidé | 9 | 0.11 |

✓ *Utile pour distinguer le biodiesel de différentes origines (animale, végétale) ou issu de différents traitements*

Conclusions

Une caractérisation analytique profonde des monoacylglycerides (MG) dans EMAG biodiesel par HPTLC-densitométrie-Tandem MS est possible

- 1) une détermination quantitative **moyenne** de monoacylglycerides comme **classe de lipides**, par densitométrie **UV** (MG insaturés) ou **fluorescence-induite** (MG saturés+ insaturés).
- 2) une identification structurelle directe, rapide and relevante des espèces moléculaires individuelles par ESI(+)-MS/MS (trap d'ions)
- 3) obtention d'un profil représentatif des MG par ESI(+)-MS.
- 4) normalization des ions ESI-MS pour obtenir la composition semiquantitative des espèces moléculaires individuelles à partir des pourcentages MG préalablement obtenus par densitométrie.

Merci de votre attention