

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES TRIGLYCERIDES POURQUOI ET COMMENT ?

Partie I : Apport de la Chromatographie en Phase Gazeuse

Marie-Geneviève MALOUMBI¹, Sylvie HERON, Alain TCHAPLA

¹*Equipe pluridisciplinaire de recherche sur l'alimentation et la nutrition (EPRAN), Faculté des sciences BP 69,
Brazzaville, Congo*

²*Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA 3343, LETIAM, IUT d'Orsay, Plateau du Moulon, 91400
Orsay, France*

Correspondance : mgmaloumbi@yahoo.fr ou sylvie.heron@iut-orsay.fr

(Reçu le 22/07/2005 – Accepté après corrections le 24/01/2006)

Résumé : La structure et la composition des triglycérides déterminent la fonctionnalité des huiles et des graisses dont ils sont les constituants majeurs. La caractérisation des triglycérides offre plusieurs perspectives dans des domaines divers. Ils peuvent intégrer la composition de nombreux produits comme les alicaments, les suppléments nutritionnels, ou encore sont sous forme d'additifs (excipient) dans la formulation des principes actifs. La régiospécificité des triglycérides est d'un grand intérêt pour comprendre les mécanismes physiologiques et sa connaissance liée à l'isolement de l'isomère actif conduit à maîtriser les affections cardiovasculaires dues à l'excès de consommation des triglycérides.

Dans cette revue séparée en deux parties, nous nous proposons de faire le bilan des techniques chromatographiques actuellement utilisées pour l'analyse structurale des triglycérides. Dans cette première partie, seuls les apports de la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) seront reportés. De manière générale, la chromatographie gazeuse capillaire donne soit la composition primaire en acides gras après transestérification des triglycérides, soit la composition secondaire en triglycérides par analyse directe de ceux-ci par CPG à haute température. Les solutions technologiques et les contraintes de telles analyses sont décrites.

Mots-clés : Triacylglycérides, Chromatographie en phase gazeuse

Abstract: Physical and biochemical properties of oils and fats are related to their triacylglycerol composition as well as their chemical structure. The knowledge of this composition is of importance in many areas. They are present in a lot of manufactured products such as supplemented foods or additives in formulated parent drugs. The regioselectivity of triacylglycerols is of fundamental importance to understand physiological mechanisms of their biological actions. Its determination is related to the bioactive isomer isolation. This leads to control cardiovascular disease due to the excess of their consumption.

In this review, divided in two successive parts, we report the main results which could be obtained on triacylglycerols composition using the chromatographic techniques. In this first part, only the contribution of capillary gas chromatography (CGC) experiments will be reported. In a general way, gas chromatography leads to the TG primary composition, obtained from ester analysis after TG transesterification. The TG secondary composition could be also obtained by CGC using direct injection and high temperature analysis. Powerful and restriction as well as technological solutions to lead the two types of analysis are described.

Key words: Triacylglycerols, Capillary gas chromatography,

I. INTRODUCTION

Les lipides aussi bien d'origine animale (graisses, huiles, beurres) que végétale (huiles, beurres) sont des mélanges complexes formés à 99 % de triglycérides, le reste étant des composés mineurs tels que les phospholipides (lécithines), les stérols (zoostérols, phytostérols) ou encore les vitamines liposolubles (A, D, E, K). Insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques, les lipides sont des produits à haute valeur énergétique (9 kcal/g), qui sont lentement digérés, procurant au consommateur un sentiment de satiété. En outre, ils sont responsables de la flaveur des produits alimentaires et contrôlent leur consistance^[1].

Comme constituants cellulaires, les lipides interviennent dans la transmission de l'information à travers les membranes biologiques en guise de seconds messagers^[2,3].

Les triglycérides (TG) ou triacylglycérols (TAG) résultent de l'estérification des fonctions alcools du glycérol par différents acides gras. Leurs propriétés physiques, chimiques, spectroscopiques, et nutritionnelles sont liées à la structure de ces acides gras (AG). Les AG peuvent être semblables ou différents. Si les trois acides gras sont identiques, les triglycérides sont homogènes. Par convention ils sont représentés par : $R_1R_1R_1$ où R représente le résidu alkyl de la chaîne hydrocarbonée de l'AG fixé sur le glycérol. Si par contre soit deux soit trois acides gras sont différents les triglycérides sont mixtes. Ils sont représentés respectivement par $R_1R_2R_3$ et $R_1R_1R_3$ ^[4].

Par ailleurs, si un des groupements alkyles (R_1 , R_2 ou R_3) possède une ou plusieurs doubles liaisons, les triglycérides sont dits insaturés, sinon ce sont des triglycérides saturés.

Les TGs se caractérisent par le nombre total de carbone (CN) des trois chaînes des acides gras, leur degré d'insaturation, la position et la configuration de leurs

doubles liaisons. C'est ainsi qu'on assiste à une grande diversité de triglycérides isomères, tels que les isomères de position, les isomères géométriques et les isomères optiques.

Les acides gras constitutifs des triglycérides se caractérisent par des chaînes alkyles non ramifiées, à nombre pair de carbone (4 à 24) dans la majorité des huiles et des graisses dont la composition a été déterminée^[4]. Lorsque les chaînes portent des doubles liaisons (cas des acides gras poly insaturés (AGPI)), celles-ci, pouvant aller jusqu'à six, sont en général séparées par un groupement $-CH_2-$ et sont principalement en configuration cis (Z).

Il existe cependant des exceptions : certains TGs sont constitués par des AG à nombre impair de carbone (tel que par exemple l'acide heptadécanoïque), des chaînes possédant des cycles saturés, des doubles liaisons en configuration trans (E) ou des chaînes possédant des insaturations conjuguées, c'est le cas des AGs polyinsaturés conjugués (AGPIC) tels que par exemple l'acide α éléostéarique (Z9, E11, E13 : C18 :3) et l'acide ruménique (Z9, E11 : C18 :2)^[4].

L'isomérisation optique implique l'absence d'un plan de symétrie dans la molécule. Bien que le glycérol en possède un, les triglycérides présentent une activité optique lorsque les groupements hydroxyles primaires (C_1 et C_3) du glycérol sont estérifiés par des acides gras différents^[4]. Par conséquent, chaque espèce de triglycérides peut se différencier en isomères régiospécifiques en déterminant la position exacte des 3 acides gras sur le glycérol. La stéréochimie des TGs est décrite par le système de numérotation stéréospécifique ou sn : stereospecific numbering adopté par la commission mixte de nomenclature IUPAC-IUB^[5]. Cette numérotation permet de préciser sans ambiguïté la structure des isomères de position et des isomères optiques. Les atomes de carbone (C) du glycérol étant

numérotés de 1 à 3 en projection de Fischer, le deuxième groupement hydroxyle du glycérol se retrouve à gauche de C-2. L'atome de carbone placé au-dessus de C-2 devient le C-1 et celui disposé au-dessous de C-2 devient C-3, ainsi les acides gras selon leur disposition sur le glycérol, peuvent être désignés par sn-1, sn-2 et sn-3 en mettant le préfixe sn avant le nom du composé. De cette façon, une seule espèce de molécule est identifiée en spécifiant par ordre, les positions sn-1, sn-2 et sn-3 [6].

Toutes les propriétés chimiques et physiques des isomères optiques sont identiques, ou très proches, de telle sorte que leur identification et leur séparation sont extrêmement délicates et requièrent des techniques très performantes.

Vu la diversité des TGs et le nombre d'isomères possibles, l'analyse de la composition d'une huile en TGs est un véritable défi. Le Tableau I met évidence le nombre d'isomères possibles de TGs d'une huile renfermant n acides gras. Il donne le nombre maximum d'isomères obtenus par calculs à partir de leur composition primaire, elle-même obtenue par analyse quantitative après transestérification d'une huile.

Tableau I : Nombre de triglycérides d'une matière grasse contenant n acides gras différents.

Nombre d'acides gras n	Nombre de triglycérides		
	Sans distinction des isomères de position $(n^3+3n^2+2n)/6$	Sans distinction des isomères optiques $(n^3+n^2)/2$	En comptant tous les isomères n^3
1	1	1	1
2	4	6	8
3	10	18	27
4	20	40	64
5	35	75	125
10	220	550	1000

Pour accéder à cette composition en triglycérides (Tableau I), des méthodes statistiques basées sur une distribution aléatoire des acides gras sur les trois chaînes d'un triglycéride sont utilisées. La

composition est alors donnée par les équations suivantes [7].

$$\% \text{ stat } [R_1R_2R_3] = (\% R_1)^3 \cdot 10^{-4}$$

$$\% \text{ stat } [R_1R_1R_2] = [(\% R_1)^2 \cdot (\% R_2)] \cdot 3 \cdot 10^{-4}$$

$$\% \text{ stat } [R_1R_2R_3] = [(\% R_1) (\% R_2) (\% R_3)] \cdot 6 \cdot 10^{-4}$$

Ces résultats permettent la plupart du temps d'établir des corrélations avec les résultats expérimentaux et d'aider à l'identification en sachant toutefois qu'il peut y avoir des cas où la répartition naturelle ne suit pas cette distribution au hasard, principalement à cause des processus de biosynthèse spécifiques propres à chaque espèce [8].

II. INTERET DE L'ANALYSE DES TRIGLYCERIDES

La caractérisation des TGs trouve des applications dans divers domaines autres que la nutrition, l'agroalimentaire ou la médecine. En archéologie, l'usage des techniques analytiques en vue de déterminer la composition en TG de certains échantillons s'avère nécessaire pour mieux comprendre la composition des œuvres d'art, l'authenticité et la pureté des substances utilisées [9]. Ceci nécessite souvent la recherche des composés à l'état de traces. L'environnement y trouve un outil indispensable dans la recherche de l'innocuité des insecticides et des polluants, il en est de même en parfumerie, cosmétologie et pharmacie pour la fabrication et la pureté des additifs utilisés pour formuler les principes actifs. En parfumerie, cette étape a longtemps été indispensable dans la préparation des huiles essentielles pour la technique d'enfleurage. L'analyse des triglycérides est fondamentale dans l'agroalimentaire où la qualité nutritionnelle des denrées passe par le contrôle de leur authenticité, de leur pureté et de leur conformité aux normes [10]. Les lipides structurés rajoutés aux produits naturels quelquefois appelés « alicaments », sont assimilés aux ingrédients alimentaires ou suppléments nutritionnels. Ils constituent actuellement

un sujet important de développement en chimie des lipides depuis qu'on a réussi à incorporer de façon précise par synthèse enzymatique, les groupements acyl sélectionnés sur les positions spécifiques du glycérol ^[11].

En outre, il s'avère que dans les graisses partiellement hydrogénées, le nombre d'isomères géométriques et de position est très élevé du fait, d'une part de la configuration cis et trans et d'autre part de la diversité des positions des AG sur le glycérol. L'analyse des AG trans dans les huiles hydrogénées est devenue systématique depuis que leur consommation a soulevé des questions en terme de sécurité alimentaire donc de santé publique.

L'analyse des TGs permet également de mettre en évidence les qualités organoleptiques d'un produit, par la détermination du profil des espèces moléculaires de TG, ce qui permet de comprendre plusieurs propriétés physiques d'une huile ou d'une graisse. Dans les produits alimentaires par exemple qui contiennent des niveaux significatifs d'huiles, le comportement des produits peut dépendre de la composition des TGs de l'huile. C'est ainsi que le beurre de cacao est la seule phase dans le chocolat déterminant la dispersion des autres constituants et de tout le comportement physique du chocolat ^[12].

Par ailleurs, l'analyse des triglycérides s'avère d'une importance capitale en médecine et en physiologie humaine ^[13, 14], pour la compréhension du métabolisme des lipides, dans la mesure où la matière grasse alimentaire peut influencer les maladies coronaires, les affections inflammatoires et la carcinogenèse, par exemple la recherche de certains TGs possédant des AG conjugués de structure spécifique ^[15]. En effet, les triglycérides alimentaires après digestion par lipolyse et absorption, doivent être assimilés par les cellules en fonction de leurs besoins soit en les dégradant, soit en les stockant dans le tissu adipeux ou encore en les régénérant par

lipogenèse. Il existe en effet plusieurs voies de biosynthèse de triglycérides, la principale étant celle de l'alpha-glycérol phosphate (sn-glycérol-3-phosphate). Elle commence par l'acylation du sn-glycérol-3-phosphate en positions sn-1 et sn-2 grâce aux transférases spécifiques pour former l'acide phosphatidique, précurseur des triglycérides et des phospholipides ^[16, 17]. Une phosphatase hydrolyse le groupement phosphate et le résidu 1,2-diacyl-sn-glycérol est acylé par une future transférase en triacyl-sn-glycérol ^[18, 19].

Les triglycérides présents dans les huiles végétales ont la particularité d'avoir les acides gras saturés presque exclusivement en positions externes sn-1 et sn-3, alors que la position interne sn-2 est largement occupée par les AG polyinsaturés ^[20-22].

La distribution des AG sur les TGs issus des matières grasses de tissus animaux varie en fonction des espèces animales et de la localisation du tissu adipeux au sein de l'organisme. Cependant, chez la plupart des espèces les AG saturés tendent à occuper la position sn-1, bien que des taux substantiels d'acide oléique peuvent se retrouver en cette position. Les acides gras insaturés et certains acides gras saturés à chaîne moyenne (acide myristique) sont beaucoup plus en position interne sn-2. Enfin, il y a quelques préférences pour les acides gras à longue chaîne d'être localisés en position sn-3 ^[23].

Par ailleurs, il a été démontré que la régiospécificité des triglycérides influencerait de façon importante la composition et la taille des lipoprotéines, de même que le métabolisme du cholestérol-ester et des acides gras polyinsaturés ^[24].

Les triglycérides plasmatiques, principale réserve énergétique de l'organisme, sont de deux origines, exogène (alimentaire) et endogène. Ceux provenant de l'alimentation sont le résultat de l'assemblage des acides gras avec le glycérol au sein des entérocytes dans la muqueuse intestinale; associés avec le cholestérol, ils forment les chylomicrons

(lipoprotéines riches en triglycérides alimentaires) ^[25]. Par contre les triglycérides endogènes synthétisés dans le foie par les hépatocytes sont à l'origine des VLDL (lipoprotéines de très basse densité riches en triglycérides endogènes). Sous l'action de la lipoprotéine lipase, les chylomicrons et les VLDL libèrent les acides gras et se transforment en lipoparticules résiduelles appauvries en triglycérides appelés les remanents des chylomicrons et les IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire). Les acides gras libérés sont alors utilisés par les tissus comme élément énergétique ou stockés par les adipocytes après recombinaison en triglycérides.

Par conséquent, l'hypertriglycéridémie est une entité hétérogène pouvant refléter l'accumulation de chylomicrons, normalement absents du plasma chez le sujet à jeun, et /ou de VLDL, et/ou de lipoprotéines résiduelles issues de la dégradation périphérique de ces lipoprotéines ^[26].

Plusieurs travaux ont montré que les triglycérides sont un facteur de risque cardiovasculaire ^[27-32]. Il semble que les hypertriglycéridémies sévères présentent aussi un risque de pancréatite aiguë pouvant conduire au diabète, et même à des infections inflammatoires.

Aussi, la réduction de la mortalité due aux maladies cardiovasculaires chez les populations consommant l'huile de poisson a attiré l'attention des chercheurs sur la structure de ces huiles ^[33]. Ce fait a été fondamental dans la caractérisation des TGs et de leurs AG pour comprendre le métabolisme des lipides et pour produire des produits alimentaires de bonne qualité nutritionnelle.

Par conséquent, il est fondamental d'acquérir une meilleure connaissance de la structure des TGs et de la distribution de leurs acides gras sur le glycérol par des méthodes analytiques capables de déterminer simultanément la composition des TGs et le taux des AG constitutifs

provenant d'échantillons d'origine extrêmement variée.

Au regard de ce qui précède, il est nécessaire de disposer de méthodes fiables, performantes pouvant caractériser sans ambiguïté les TGs. Si on se rappelle que la plupart des corps gras comportent une dizaine d'AG principaux, la puissance des méthodes séparatives à mettre en œuvre apparaît clairement à la lecture du Tableau I et permet de comprendre les stratégies mises en œuvre.

Aussi, une variété de techniques chromatographiques est disponible actuellement pour l'analyse des TGs. Compte tenu de leur grand nombre potentiel, elles privilégient leur séparation principalement grâce à la sélectivité du système séparatif (chromatographie en phase liquide sur colonne remplie), ou grâce à l'efficacité (chromatographie en phase gazeuse capillaire). Dans cette première partie, nous ne décrivons que les apports dus à la chromatographie en phase gazeuse.

III. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)

En CPG, les triglycérides peuvent être analysés directement mais aussi sous forme d'esters après réaction de transestérification, ce qui se fait de manière plus courante.

3. 1. Transestérification des TGs

Les TGs étant des composés de haut poids moléculaire ($300 \leq M \leq 1200$), ils sont très peu volatils et cela pose un problème d'analyse surtout lors de l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse. C'est pourquoi une première technique consiste à transestérifier les TGs et analyser les esters d'acide gras formés.

Les esters d'acides gras analysés sont le plus souvent sous forme d'esters méthyliques ^[36,37]. Cependant, on peut trouver d'autres dérivés, tels que les esters picolynyl ^[38-40] ou des dérivés du 4,4-

diméthyl-oxazoline ^[41,42]. Ces deux types de dérivés présentent l'avantage lors d'une identification par spectrométrie de masse (SM) de donner des ions permettant de meilleures identifications et de déterminer sans ambiguïté la position des insaturations. Les esters d'acides gras peuvent également être transestérifiés en esters propyliques moins couramment utilisés, mais évitant les phénomènes de discrimination à l'injection en CPG et donnant une meilleure analyse quantitative. Outre l'identification par SM qui nécessite d'avoir un appareillage à sa disposition, celle-ci peut se faire à partir de standards commerciaux et comparaison des grandeurs de rétention. Néanmoins, tous les composés ne sont pas disponibles, en particuliers les composés insaturés.

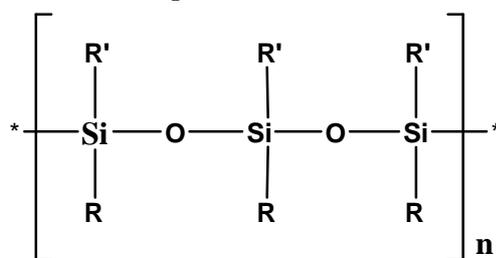
L'ensemble des méthodes basées sur la transestérification des TGs présentent des inconvénients à savoir que la transestérification n'est toujours pas quantitative, ce qui peut fausser les résultats obtenus et que ces méthodes permettent de connaître la composition en acides gras totaux mais pas leur répartition sur les TGs ^[36-38, 43-49].

3. 2- Analyse directe des TGs

La CPG connaît des succès remarquables dans la séparation des mélanges depuis sa conception par James et Martin [50]. En 1962 Kuksis et Mc Carthy [51] ont publié la première analyse en CPG des TGs naturels en analysant la matière grasse du lait. A cette période on utilisait des colonnes remplies en verre ou en acier inoxydable, les colonnes capillaires ne sont apparues que dans les années 1970 ^[52] pour l'étude des TGs. Tvrzicka et Mares ^[53] ont fait état d'un nombre d'avantages des colonnes capillaires sur les colonnes remplies tel qu'une meilleure efficacité de séparation, une bonne reproductibilité des temps de rétention, des temps d'analyse plus courts et une durée de vie plus longue des phases stationnaires.

3. 2. 1 La séparation

Les TGs ayant une très faible volatilité, leur analyse par CG nécessite de travailler à haute température. Bien que de nombreuses séparations se fassent de manière courante, les conditions de travail approchent les limites de stabilité thermique des composés, mais aussi des phases stationnaires ^[36], les températures atteintes lors des programmations pouvant aller jusqu'à 350-360°C. Au départ, les phases stationnaires utilisées étaient des phases liquides d'élastomères de silicone très peu polaires, de haute stabilité thermique. Aujourd'hui on a des phases stationnaires en polysiloxane qui possèdent un pouvoir de polymérisation à degré variable influant sur leur volatilité, elles peuvent être représentées de la sorte:



Plus n est grand, plus la volatilité est faible, plus la phase stationnaire tient à haute température. Ainsi par exemple, OV1 dont n est compris entre 40000 et 50000 a une température limite maximale supérieure à celle de OV 101 dont n = 400. Toutefois, il se pose souvent le problème de ressuage (« bleeding ») particulièrement gênant en SM. C'est la raison pour laquelle certaines phases stationnaires comportent des groupements carborane insérés au sein du polysiloxane pour augmenter la stabilité thermique et diminuer le ressuage. Si R = R' = CH₃ (polydimethylsiloxane) les phases stationnaires sont non polaires. Si R = CH₃ et R' = Phényl, (polymethylphenylsiloxane) les phases stationnaires sont légèrement polaires. Leur polarité augmente légèrement avec le pourcentage de groupement phényl. Enfin si R = CH₃ et R' = CH₂CH₂CN, (polymethylcyanosiloxane) les phases stationnaires possèdent une polarité permanente. Celles-ci sont

commercialisées sous une variété de noms de marque différente ^[55,56], les Tableaux II, III et IV font la classification de leur structure.

Tableau II : Phases stationnaires non polaires

	% vinyle	% phényle	% cyanopropyle	% méthyle
SE 52, OV 73	-	5	-	95
CP Sil 8, DB 5				
SE 54	1	5	-	94

Tableau III : Phases stationnaires moyennement polaires

	% vinyle	% phényle	% cyanopropyle	% méthyle
OV 1701, BP 10	1	7	7	85
CP Sil19, SP B7				
OV 7	-	20	-	80
OV 61	-	33	-	67
OV 17	-	50	-	50

En général, les colonnes de phases stationnaires en silicone polyméthylés ne permettent pas la séparation totale des composés saturés et insaturés de même longueur de chaîne et de même degré d'insaturation. Avec de tels types de phases, les séparations sont effectuées uniquement sur la base des différences de pressions de vapeur qui sont principalement corrélées aux masses moléculaires des composés, c'est-à-dire au nombre de carbone. Pour pouvoir obtenir des séparations basées à la fois sur le nombre de carbone et le degré d'insaturation, il faut alors utiliser des phases stationnaires polaires à fort taux de phényl-silicones ^[36,56,57], ou même de cyanopropylsilicone ^[46,54,57-60] (Tableau IV). Ces dernières permettent même de séparer les TG constitués d'AG isomères cis (Z) ou trans (E).

Tableau IV : Phases stationnaires polaires

	% vinyle	% phényle	% cyanopropyle	% méthyle
OV 225, DB 225	-	25	25	50
CP Sil 43				
SP 2300, Silar 5CP	-	50	50	0
SP 2340, Silar 10C	-	-	75	25
CP Sil 88	-	-	100	0

Elles développent d'autant plus d'interactions spécifiques avec les TGs insaturés que leur structure possède un fort taux de substituants insaturés ou de groupement CN. Il est possible de prédire leur spécificité vis-à-vis de la séparation de ces TGs à partir des indices partiels de Mac Reynolds relatifs au benzène. Plus cet indice est élevé, plus les TGs insaturés seront séparés des TGs saturés de même longueur de chaîne.

L'utilisation de colonnes capillaires avec des phases stationnaires thermostables à base de polysiloxane ayant des radicaux méthyle, phényle et cyanopropyle a permis une plus haute efficacité de séparation des TGs. Ainsi l'existence des colonnes greffées a amélioré considérablement les propriétés des colonnes en augmentant leur durée de vie et en réduisant la dérive de la ligne de base à des températures élevées.

Les longueurs de colonne sont habituellement de quelques dizaines de mètres (25-30 m) et l'épaisseur du film entre 0.1 et 0.2 μm ^[38,40]. Des progrès dans l'efficacité de la séparation des TGs ont été enregistrés en utilisant des colonnes capillaires avec des phases de type polysiloxane contenant une forte proportion de groupements phényle (50-65%). La CPG à haute température sur des phases stationnaires de polarité moyenne a été largement appliquée pour la séparation des TGs dans une gamme étendue d'huiles

et de graisses [58,60-64]. Les colonnes capillaires greffées aux polysiloxanes mixtes méthyle phényle sont conditionnées à des températures de 365 à 390°C. De telles températures fragilisent la couche protectrice de polyimide, ce qui augmente leur perméabilité à l'oxygène et réduit drastiquement leur durée de vie.

Mayer et al. [65] ont décrit la préparation des colonnes capillaires greffées avec 75% de diphenyle / 25% de polysiloxane méthyle, une phase stationnaire plus polaire que les autres phases phényle couramment utilisée. Sa polarité permet une légère amélioration de la résolution des TGs qui diffèrent par une double liaison comme par exemple SOO et OOO.

La plupart du temps, les analyses des acides gras les plus fréquemment présents dans un corps gras sont conduites sur des colonnes de grande longueur (30 à 60 m) enduites ou greffées de phases stationnaires protiques de polarités intermédiaires: type polyéthylène glycol (Supelcowax, DB Wax, CPWax 52 CB, OV 351.....) ou polypropylène glycol (Pluronic). Ces colonnes et ces phases ne sont ni assez efficaces ni assez sélectives pour la séparation d'isomères de configuration particuliers comme les acides gras cis (Z) et trans (E) et les isomères de position des doubles liaisons tels que par exemple les isomères conjugués de l'acide linoléique. Pour séparer de tels solutés de volatilité et polarité extrêmement voisines il est nécessaire d'utiliser les phases stationnaires les plus polaires qui soient telles que les polysiloxanes substitués à 100% par des groupements cyanopropyl (CP Sil 88, OV 275....), ou au minimum un mélange 75% de cyanopropyl / 25% de méthyl polysiloxane (BPX 70, SP 2340, Silar 5CP, Silar 10C....) [14]. Ces phases peuvent être choisies grâce à leur indice de Mac Reynolds-Rohrschneider. Deux conditions supplémentaires sont nécessaires: utiliser des colonnes de très grande longueur (100 ou 120 m) et le dihydrogène comme gaz vecteur à des

débits qui soient deux à trois fois supérieurs au débit optimum [66]. Malgré une optimisation du programme de température proposé par Collomb et Bülher, aucune de ces colonnes ne permet une séparation correcte de trois isomères conjugués de l'acide linoléique: les E7-Z9: C18:2, E8-Z10: C18 :2 et Z9-E11: C18 :2 [67]. Pour observer tous les isomères la transestérification des TG doit être conduite en milieu basique. L'analyse conjointe des esters isopropyliques (sur BPX 70) et méthyliques (sur CP Sil 88) permet d'obvier à l'application de facteur de correction lors d'une analyse quantitative de ces esters, puisque, en détection FID, les facteurs de réponse relatifs des esters isopropyliques (FAIPE) sont très voisins de 1 pour tous les acides gras et que les facteurs de réponses relatifs des esters méthyliques (FAME) des esters à plus de 18 atomes de carbone peuvent également être approximés à 1 [67]. La seule condition pour que ceci soit respecté est d'opérer de telle manière qu'il n'y ait pas de discrimination à l'injection.

3. 2. 2 L'identification

Une des difficultés majeures des méthodes chromatographiques réside dans l'identification, à savoir dans la prédiction du facteur de rétention et plus usuellement du temps de rétention (tr) pour un composé dont il n'y a pas de standard commercialisé. Pour palier à cela, Kovats a établi en 1954, une relation entre le logarithme du temps de rétention réduit et le nombre de carbone (CN) des composés de séries homologues conduisant aux indices de rétention et pouvant être utilisés pour identifier les composés d'un chromatogramme. Ces indices de rétention classiques (équation 1) [68] ont par la suite été remplacés par la longueur équivalente de chaîne (ECL) (équation 2) ou le nombre équivalent de chaîne (ECN) [13,69]. Ce système d'identification est directement dérivé de la notion d'indices de Kovats et utilise comme référence les esters méthyliques des acides gras à la place des

n-alcane. Il a été développé pour pallier au léger manque de reproductibilité des valeurs d'indices de rétention lors de l'analyse soit sur des colonnes d'épaisseur de film (ou de pourcentage d'imprégnation) différente, soit sur une même colonne utilisée à des températures isothermes différentes ou avec des rampes de programmation de température différentes. L'avantage de prendre comme soluté de référence des composés de structure chimique identique à ceux à identifier est que l'évolution de leur comportement chromatographique vis-à-vis de paramètres tels que l'évolution de la phase stationnaire ou la température d'analyse par exemple est identique. Pour déterminer les ECL il faut encadrer le composé par les deux esters linéaires pairs les plus proches du point de vue de leur temps de rétention tel que:

$$IK(x) = 100 n_z + 200 [\log t'_R(x) - \log t'_R(z) / \log t'_R(z+2) - \log t'_R(z)] \quad (1)$$

$$ECL(x) = n_z + 2 [\log t'_R(x) - \log t'_R(z) / \log t'_R(z+2) - \log t'_R(z)] \quad (2)$$

t'_R étant le temps de rétention réduit, n_z le nombre de carbone de l'ester Z, x l'ester d'intérêt, z l'ester saturé pair élué juste avant x et z+2 l'ester saturé élué après x.

Actuellement de nombreux laboratoires procèdent au couplage chromatographie / spectrométrie de masse pour résoudre les problèmes d'identification des composés [70-73]. Cependant, une bonne identification dans le cas d'analyse de mélanges complexes nécessite conjointement l'identité de spectres de masse enregistrés et des valeurs de ECL (ou de IK) des solutés analysés avec ceux de la littérature ou de la banque de données. Il est même souvent opportun de conduire cette investigation sur deux colonnes de nature différente (une phase stationnaire apolaire et une phase stationnaire polaire). La complémentarité des informations obtenues permet alors une détermination de la composition beaucoup plus fiable.

3. 2. 3 L'injection

La haute efficacité de séparation constitue un grand avantage en CPG capillaire pour l'étude des TGs. Cependant, des discriminations peuvent apparaître pendant l'introduction de l'échantillon et les composés hautement insaturés peuvent être perdus à des degrés divers, en raison des conditions agressives de température inhérentes à l'élution des TGs [73]. De la même manière, les composés les moins volatils peuvent ne pas être transférés totalement dans la colonne lors de l'utilisation d'injecteur chaud (injection en mode split/splitless). La technique d'injection a été considérée comme un élément déterminant de l'exactitude et de la précision que peuvent apporter les composés de haut poids moléculaire peu volatils, lors du transfert de l'échantillon depuis la seringue jusqu'à la colonne [74-79]. Selon le type d'injecteur et en fonction de sa température, les techniques d'injection capillaire peuvent être divisées en deux groupes, tel que l'injection directe dans la colonne (on column) et l'injection en mode split/splitless [73]. Grob [78] a reporté que l'injection « on column » est la technique de choix, réduisant ou éliminant la décomposition thermique, la discrimination en masse et d'autres effets associés à l'injection split/splitless. Il a trouvé que le taux de récupération des TGs était de 80% en comparaison au n-alkane (n-penta-décane), alors que la récupération de TGs était réduite pour les injections en mode splitless ou split. Hinshaw et Seferovic [79] et Garcia et al. [74] ont démontré qu'une programmation de température de vaporisation (PTV) est une alternative à l'injection on column. La programmation de température, en commençant à une température supérieure au point d'ébullition du solvant puis montant très rapidement à une température assez haute pour transférer les analytes vers la colonne, peut être vue comme une tentative pour combiner les avantages des techniques traditionnelles de l'injection on column et ceux des modes split/splitless,

technique d'injection discriminative pour les composés peu volatils. Une alternative possible pour l'analyse de ces composés peu volatils est l'utilisation de l'injecteur à aiguille mobile (Injecteur de Ross) manuel ou automatisé (AFS). Il faut alors retenir que cet injecteur discrimine les composés légers.

Les aspects quantitatifs de la séparation des TGs sur colonne capillaire ont été étudiés en détail par Mares et Husek^[80] et Mares^[75]. Ces derniers ont montré à partir du taux de récupération des TGs que les facteurs de correction dépendent de plusieurs paramètres tels que la technique d'injection, la qualité de la colonne, le débit du gaz vecteur, la quantité et la masse moléculaire des substances. La conclusion principale de cette étude qui valide les résultats de Carelli et Cert^[76], est que les pertes importantes des TGs dépendent dans une large mesure des tr. Les paramètres chromatographiques conduisant à écourter les temps d'élution d'un composé (colonne courte, film fin de la phase stationnaire, moins grande viscosité du gaz vecteur, utilisation de l'hydrogène à la place des autres gaz vecteurs, gradient de température) améliorent considérablement son taux de récupération. L'optimisation du système CPG capillaire pour la séparation des TGs n'est donc pas un simple compromis entre la séparation et le temps d'analyse, mais un équilibre délicat entre efficacité de la séparation et récupération des TGs tardivement élués.

IV. CONCLUSION

La caractérisation des corps gras en CPG capillaire à partir de l'analyse des esters d'acides gras obtenus par transestérification des TGs est relativement simple car le nombre de composés à séparer n'est pas trop élevé. Elle permet d'obtenir en routine la composition primaire globale de ces corps gras et de pouvoir facilement les comparer entre eux. Le seul problème réel est de maîtriser l'injection pour éviter toute discrimination

et obtenir des bilans quantitatifs fiables. Les phases stationnaires de CPG capillaire disponibles actuellement permettent de résoudre quasiment tous les problèmes au prix du temps d'analyse. L'analyse directe des TGs en CPG capillaire est beaucoup plus difficile compte tenu du grand nombre d'isomères. Elle nécessite l'utilisation de colonnes efficaces (grande longueur, petit diamètre), très sélectives et stables à haute température. L'utilisation de colonnes de faible épaisseur de film et de dihydrogène comme gaz vecteur est nécessaire à l'obtention de séparations optimales. De manière bien plus drastique que pour l'analyse des esters, la maîtrise de l'injection est indispensable. Malgré un grand panel de phases stationnaires disponibles, tous les isomères des TGs ne sont pas séparés. L'utilisation d'autres techniques chromatographiques complémentaires doit donc être envisagée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Molimard P., Le Quere J.L., Spinnler H. E., *Oléag. Corps gras, Lipides* (1997) 4, 301-11
- [2] Trémolière A, *Analisis* (1998) 26, M19-M26
- [3] Petit J. M., Maftah A., Julien R., *Biologie cellulaire* Ed. 2003, Dunod liège
- [4] Karliskind A. *Manuel des corps gras, principaux constituants chimiques des corps gras*, Lavoisier Edition 1992, France
- [5] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatura, *J. lipid Res.* (1967) 8, 523-528
- [6] Mu H., Ehay C., *Progress in lipid Res.* (2004) 43, 105-133
- [7] Merritt C., Vajdi Jr. M., Kayser S. G., Halliday J. W, Bazinet M. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (182) 59, 422-432
- [8] Zeitoun M. A. M.; Neff W. E., Selke E., Mounts T. L., *J. Liq. Chromatogr.* (1991) 14, 2685-2698
- [9] Aparicio R., Aparicio-Ruiz R., *J. Chromatogr. A* (2002) 881, 93-104
- [10] Sébedio L., Christie W. W., *Trans fatty acids in human nutrition* Edition 1998 The Oily Press LTD, Scotland DD5 IPJ
- [11] Osborn H.T., Akoh C.C., *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety* (2002) 3, 93-103

- [12] Lipp M. Anklam E., Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate, *Food Chem.* (1998) 62, 73-97
- [13] Christie W.W. Advances in lipid, methodology-four Edition 1997, The Oily Press LTD, Scotland DD5 IPJ
- [14] Sébedio J-L, Perkins E., New trends in lipid and lipoprotein analyses Edition 1995 AOCS press, Champaign USA
- [15] Berdeaux O., Juanéda P., Sébedio J.L., *Analisis* (1998) 26 (3), M45-M51
- [16] Vernon R. G., Barbe M. C., Travers M. T., *INRA Prod. Anim.* (1999) 12, 319-327
- [17] Kent C., *Ann Rev Biochem.* (1995) 64, 315-45
- [18] Coleman R. A., Lee D.P., *Progress in Lipid Research* (2004) 43,134-176
- [19] Lewin T.M., Coleman R.A., *Biochimica et Biophysica Acta* (2003) 1634, 63-75
- [20] Grondin I.Smadja J., Soulier J., *OCL* (1997) 4(6) 459-463
- [21] Aranda F., Gomez-Alonso S., Rivera del Alamo R. M., Salvador M. D., Fregapane G. *Food chemistry* (2004) 86, 485-492
- [22] Blaise P., Wolf R., Farines M., *OCL* (1997), 4 (2), 135-140
- [23] Ruiz-Guitierrez V., Barron L. J, R., *J. Chromatogr. B* (1995) 671, 133-168
- [24] Ramirez M., Amate L., Gil A., *Early Human Development* (2001) 65, S95-S101
- [25] Mu H., Hay C. E., *Progress in lipid Research* (2004) 43, 105-133
- [26] Bruckert E., *Les hypertriglycéridémies*, Ed. 1994 J L John Libbey Eurotext, Paris-Londres
- [27] Wang Y., Jones P. J. H., Ausman L. M., Lichtenstein A. H., *Atherosclerosis* (2004) 173, 69-275
- [28] Weldon S., Mitchell S., Kelleher D., Gibney M. J., Roche H. M., *Atherosclerosis* (2004) 174, 261-273
- [29] Correia L.C.L, Magalhaes L. P., Braga J. C., Rocha, M. S. Lima J. C., Passos L.C.S., D'Oliveira A., Esteves J. P., Sposito A. C, *Atherosclerosis* (2004) 177, 71-76
- [30] North K. E., Miller M. B., Coon H., Martin L. J., Peacock J. M., Arnett D., Zhang B., Province M., Oberman A., Blangero J., Almasy L., Ellison R. C., Heiss G., *Atherosclerosis* (2005) 179, 119-125
- [31] Miller G. J., *Atherosclerosis* (2005) 179, 213-227
- [32] Takase H., Shoji K., Hase T., Tokimitsu I., *Atherosclerosis* (2005) 180, 197-204
- [33] Kestin M., Clifton P., Belling G. B., Nestel P., *J. Am. Clin. Nutr.* (1990) 6, 1028-1034
- [34] Laakso P., *Food rev.int.* (1996) 12, 199-250
- [35] Le Quéré J. L., Sémon E., *Analisis* (1998) 26 (3), M40-M41
- [36] Christie W. W., *Gas chromatography and lipids- A practical guide*, (1989) the oils press, Ayr, Scotland
- [37] Aitzetmuller K., Xin Y., Werner G., Gronheim M., *J. Chromatogr.*, (1992) 603, 165-173
- [38] Wretensjo I., Svensson L., Christie W. W., *J. Chromatogr.* (1990) 521, 89-97
- [39] Christie W. W., *Rev. Fr. Corps gras*, (1991) 38, 155-160
- [40] Lie Ken Jie M. S. F., Choi C. Y. C., Berger A., Berger R. G., *J.Chromatogr.*(1991) 543, 257-261
- [41] Fay L., Richli U., *J. Chromatogr.* (1991) 541, 89-98
- [42] Christie W. W., *Analisis Magazine* (1998) 26 (3), M34-M40
- [43] Liebich H. M., Wirth C., Jakober B., *J. Chromatogr.* (1991) 572, 1-9
- [44] Eder K., Reichlmayr-Lais A. M., Kirchgessner M., *J. Chromatogr.* (1991) 588, 265-272
- [45] Fiad S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1991) 68, 23-25
- [46] Bland J. M., Conkerton E. J., Abraham G., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1991) 840-843
- [47] Maurin R, K. Fellat -Zarrouck K, Bouteiller J. C., *Rev. Fr. Corps gras*, (1990) 37, 297-300
- [48] Cassidy D. M., Pratt D. A., Taylor R., Alberti K. G. M. M., Laker M. F., *J. Chromatogr.* (1989) 491, 1-13
- [49] Yan X., Barlow P. J., Craven C., *Food Chemistry* (1991) 40, 93-99
- [50] James A. T., Martin A. J., *Biochem. J.* (1952) 50, 679-690
- [51] Kuksis A., Mc Carthy M. J., *J. Med. Sci.* (1962) 40, 679-686
- [52] Schomburg G., Dielmann R., Husmann H., Weeke F., *J. Chromatogr.*(1976) 122, 55-72
- [53] Tvrzicka E., Mares R., *Lipid Chromatographic Analysis: Gas-liquid chromatography of neutral lipids*, Ed.1994 Shibamoto, Marcel Dekker New York USA
- [54] Bruchet A., Legrand M. F., Arpino P., Dilettato D., *J. Chromatogr.* (1991) 562, 469-480

- [55] Atlas of chromatograms, *J. Chromatogr. Sci.* (1991) 29, 318-328
- [56] Ruiz-Guitierrez V., Cert A., Rios J. J., *J. Chromatogr.* (1992) 575, 1-6
- [57] Sassano G. J., Jeffrey B. S. J., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 70, 1111-1114
- [58] Kuksis A., Myher J. J., Sandra P., *J. Chromatogr.* (1990) 500, 427-441
- [59] Rezanka T., Mares P., *J. Chromatogr.* (1991) 542, 145-159
- [60] Frega N., Bocci F., Lercker E., *Ital. J. Food Sci.* (1990) 4, 257-264
- [61] Antoniosi Filho N. R., Carrilho, E., Lanças F M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 70, 1051-1053
- [62] Alonso L., *Chromatographia* (1993) 35, 649-653
- [63] Simoneau C., Hannaert P., Anklam E., *Food Chem.* (1999) 65, 111-119
- [64] Buchgraber M., Uberth F., Anklam E., *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* (2003) 105, 754-760
- [65] Mayer B. X., Zoellner P., Lorbeer E., Rauter W., *J. Sep. Sci* (2002) 25, 60-66
- [66] Collomb M., Bülher T., *Mit. Lebens. Hyg.* (2000) 91, 306-332
- [67] Ledoux M., Thèse de doctorat INAPG, Ecole doctorale ABIES, Paris 07 Dec. 2005
- [68] Kovats E., *Helv. Chem. Acta* (1958) 41, 1915-1938
- [69] Rouessac F., Rouessac A., *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes* Masson 1995, Paris
- [70] Kiw H. Y., Salem N., *Prog. Lipid Res.* (1993) 32, 221-245
- [71] Evershed R. P., *Spec. Publ. R. Soc. Chem.* (1994) 42, 123-160
- [72] Andrikopoulos N. K., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2002) 42, 473-505
- [73] Mayer B. X., Zoellner P., Lorbeer E., Rauter W., *J. Chromatogr. A.* (1997) 758, 235-242
- [74] Garcia Regueiro J. A., Diaz I., David F., Sandra P., *J. Chromatogr.* (1994) 17, 180-183
- [75] Mares P., *J. Chromatogr.* (1988) 27, 107-133
- [76] Carelli A. A., Cert A., *J. Chromatogr.* (1993) 630, 231-222
- [77] Collomb M., Spahni M. S., Buehler T., *Trav. Chim. Aliment. Hyg.* (1998) 89, 59-74
- [78] Grob K., *J. Chromatogr.* (1979) 178, 387-392
- [79] Hinshaw J. Seferrovic W., *J. High Resol. Chromatogr.* (1986) 9, 731-736
- [80] Mares P., Husek P., *J. Chromatogr.* (1985) 350, 87-103