

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES TRIGLYCERIDES POURQUOI ET COMMENT ?

Partie II : Apport des chromatographies en phases liquide et supercritique

M.-G. Maloumbi*, S. Héron, Alain Tchapla

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

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

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

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

Summary : Triacylglycerols are the main constituents of fats and oils. Their composition and structure determine the functionality of these fats and oils. Various chromatographic methods actually exist allowing the analysis of these compounds. In previous part one of this review, we have reported the potential of Gas Chromatography. In this article we are dealing with Liquid Chromatography.

Reversed Phase HPLC is the best technique to analyse intact triacylglycerols. Argentation chromatography leads to separation of geometrical isomers. Supercritical fluid chromatography allows analysis of triacylglycerols with high boiling point or thermolabile. Hyphenated techniques (HPLC/MS) contribute to improve identification of triacylglycerols.

A general overview on the principles of triacylglycerols analysis using such methods is given.

Key words: triacylglycerols, liquid chromatography, reversed phase HPLC, argentation chromatography, supercritical fluid chromatography, stereospecific analysis.

Résumé : La structure et la composition des triglycérides déterminent la fonctionnalité des huiles et des graisses dont ils sont les constituants majeurs. Une variété de techniques chromatographiques est actuellement disponible pour l'analyse de ces composés. Après avoir reporté dans un précédent article les potentialités de la chromatographie en phase gazeuse, nous allons nous intéresser ici à la chromatographie en phase liquide.

La chromatographie liquide à polarité inversée de phases (CLPI) est la technique de choix pour l'analyse de la composition secondaire des triglycérides. La chromatographie d'argentation permet la séparation des stéréoisomères et des isomères de position. La chromatographie en phase supercritique (SFC) bien que moins utilisée que les autres chromatographies, constitue une alternative d'analyse des triglycérides très peu volatils et thermiquement labiles. Les couplages de la chromatographie avec la spectrométrie de masse de plus en plus développés contribuent à une amélioration de l'identification des triglycérides. Les solutions technologiques et les contraintes de telles analyses sont reportées.

Mots clés : Triglycérides, chromatographie liquide à polarité inversée des phases, CLHP, Chromatographie d'argentation, chromatographie en phase super critique, analyses stéréospécifiques

I- INTRODUCTION

Il est nécessaire de disposer de méthodes fiables, performantes pouvant caractériser sans ambiguïté les triglycérides (TGs). Si on se rappelle que la plupart des corps gras comportent une dizaine d'acides gras (AG) principaux^[1], la puissance des méthodes séparatives pour séparer les 550 triacylglycérols isomères résultants possibles apparaît clairement. Elle permet

de comprendre les stratégies mises en œuvre.

Après avoir décrit dans la première partie de cette revue les apports de la chromatographie en phase gazeuse^[1], nous nous proposons de décrire ici ceux de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) incluant la chromatographie liquide à polarité inversée

de phases (CLPI), la chromatographie d'argentation et la chromatographie supercritique (SFC). Ces techniques peuvent être couplées ou non en routine, à une technique d'identification spectroscopique à savoir la spectrométrie de masse et dans quelques cas particuliers l'infra rouge à Transformée de Fourier (IRTF) ^[2].

II- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A POLARITE INVERSEE DE PHASES (CLPI)

Actuellement, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est indubitablement la technique de séparation la plus largement employée pour l'analyse simultanée de toutes les classes de composés naturels y compris les lipides. Les études de mécanismes de rétention des solutés ont permis de montrer une interdépendance des trois éléments du système chromatographique (phase stationnaire, phase mobile, soluté). Le but de certaines études menées a été de décrire quantitativement les principales interactions qui apparaissent dans le système, de prédire la rétention sur cette base, ainsi que de révéler les principaux facteurs qui affectent la sélectivité et la rétention.

Du fait de la très faible volatilité des TGs, la chromatographie liquide haute performance est la technique la mieux adaptée à leur analyse. Elle peut se faire selon deux modes de séparation chromatographique, l'HPLC à polarité inversée de phases (HPLC/PI ou RP-HPLC : Reversed Phase Liquid Chromatography) et l'HPLC à polarité normale de phases (NP-HPLC : Normal Phase Liquid Chromatography).

Les tentatives d'analyse des TGs en NP-HPLC ont eu des succès limités ^[3]. L'ordre d'élution des TGs est alors déterminé par le degré d'insaturation et le nombre de carbone CN, de sorte que les TGs saturés sont élués avant leurs homologues insaturés. Le système de séparation en NP-

HPLC n'a pas le pouvoir de résolution de son homologue RP-HPLC et n'est pas en conséquence, d'usage courant.

On peut rendre compte du principe de séparation des composés en HPLC/PI par l'effet hydrophobe. En conséquence, pour les TGs la séparation est principalement gouvernée par l'influence du volume hydrocarboné et à volume hydrocarboné identique par le nombre d'insaturations.

2-1 La séparation

Une des propriétés des TGs est leur insolubilité dans les milieux aqueux, toutes les études sont donc menées dans des milieux excluant l'eau, c'est-à-dire en mode NARP (Non Aqueous Reversed Phase). Cependant tous les solvants organiques ne solubilisent pas parfaitement les TGs, il convient donc de choisir le ou les bons solvants de dissolution de l'échantillon et ensuite ceux constituant la phase mobile ^[4-5]. Une étude de l'influence des solvants d'injection a été menée par Tsimidou et Macrae ^[6]. Il s'avère que le volume injecté et la différence de propriétés entre le solvant d'injection et celui de la phase mobile ont une importance sur la forme des pics. Si un solvant fort est employé, il peut y avoir des traînées voire des dédoublements de pics; par contre s'il est trop faible il ne solubiliser pas les TGs. Les solvants ont été étudiés en terme de polarité P' établie par Rohrschneider ^[7] et il en a été déduit que plus la polarité du solvant P' (ou du mélange de solvants) est proche de celle de l'échantillon, meilleur est le chromatogramme, le meilleur cas étant évidemment la dissolution de l'échantillon dans la phase mobile elle-même ^[8-10].

Le choix de la phase mobile en HPLC est très important car il gouverne en grande part la séparation. Lorsque l'on cherche à optimiser celle-ci, on essaie d'obtenir un chromatogramme tel que les facteurs de rétention soient compris entre 2 et 10 (à la rigueur 1-20) en analyse isocratique, mais aussi et surtout à avoir une résolution suffisante pour tous les couples de solutés

du mélange ^[11-12]. Le premier critère peut être atteint en choisissant une composition de phase mobile à partir de la notion de la force éluante des solvants. L'acétonitrile est le solvant faible le plus couramment employé car fournissant les meilleures résolutions. Il est présent dans toutes les phases éluantes utilisées. Grâce à ses interactions avec les électrons π des doubles liaisons, l'acétonitrile facilite la séparation des TGs insaturés. Certains auteurs lui préfèrent cependant le propionitrile donnant de meilleures résolutions et des temps d'analyse plus courts. Afin d'obtenir des temps d'analyse acceptables et une bonne solubilisation des TGs, un solvant fort est ajouté tel que l'acétone, le dichlorométhane, ou le tétrahydrofurane. L'ajout de l'un de ces solvants forts en quantité plus ou moins importante permet de moduler le temps d'analyse et la polarité de la phase mobile ^[8-9]. Notons que l'acétone améliore la séparation de certaines paires critiques, (TGs possédant le même nombre de carbone et de doubles liaisons, mais répartis différemment sur les trois chaînes) surtout lorsqu'on utilise les colonnes C_{18} ^[13-14]. Si le THF est utilisé en grande quantité, celui-ci peut être à l'origine des phénomènes d'exclusion stérique ^[9].

Pour ce qui est de la phase stationnaire, l'unanimité est faite sur des colonnes greffées C_{18} , les colonnes C_8 donnant des sélectivités plus faibles. Signalons que les couches polymoléculaires greffées (bulk type) appelées couramment mais improprement silices polymériques offrent de meilleures séparations que les couches monomoléculaires greffées (brush type) usuellement dénommée silices monomériques ^[15]. Les silices greffées de manière dense par des couches monomoléculaires percolées à basse température ($\theta < \theta$ ambiante) permettent elles aussi la séparation des TGs. Ainsi, on peut utiliser une seule colonne de type silice polymérique percolée par des phases mobiles de composition isocratique binaire conduisant à de bonnes séparations des

paires critiques ^[3,16-22] alors qu'il est nécessaire de coupler deux colonnes C_{18} de type monomérique pour obtenir des séparations analogues au prix d'un temps d'analyse plus élevé.

Les analyses peuvent être menées aussi bien en condition isocratique qu'en gradient d'élution. Cependant lorsque les huiles ou les graisses possèdent une gamme étendue de TGs, le gradient par augmentation progressive du pourcentage de solvant fort, permet de réduire les temps d'analyse et d'affiner les pics ^[23]. Ceci s'avère indispensable pour détecter les composés minoritaires si ces derniers sortent en fin de chromatogramme.

2-2 La détection

Un des problèmes que pose l'analyse des TG en HPLC est l'utilisation d'un détecteur sensible adapté aux solutés. En effet, les TGs ne possèdent pas de chromophores qui absorbent de manière intense en UV classique à une longueur d'onde où la phase mobile n'absorbe pas; l'utilisation d'un spectrophotomètre UV est donc réduite. Certains auteurs ^[24-26] ont tout de même effectué des analyses de TGs à 205-220 nm, zone spectrale où les doubles liaisons isolées absorbent. Mais plus la longueur d'onde est faible, plus les solvants absorbent la lumière. Dans ces conditions le nombre de solvants utilisables est limité (en particulier l'acétone et le chloroforme très bons solubilisants de TGs sont interdits) et leur purification est nécessaire afin d'éliminer les impuretés susceptibles d'absorber la lumière. En conséquence, pendant très longtemps le détecteur le plus communément utilisé a été le détecteur à indice de réfraction qui malheureusement pose des problèmes. Tout d'abord, malgré de récents progrès, la sensibilité n'est pas très élevée par rapport aux solutés, mais ceci n'est la conséquence que de sa sensibilité trop élevée par rapport à de nombreuses fluctuations des conditions opératoires telles que la température, les à-coups de pression, la pression, la quantité

d'air dissoute donnant ainsi des lignes de basse difficiles à stabiliser. Enfin les gradients d'élution ne sont pas possibles car les changements d'indices de réfraction dus à la composition de solvant sont bien plus grands que ceux dus à la présence des solutés. Les TGs à analyser s'étendant sur une grande gamme de masse moléculaire, la limitation à des études en isocratique peut poser problème, rendant ce type de détecteur difficilement utilisable.

Une méthode de détection qui n'est pas affectée par les changements de composition de la phase mobile, permettant ainsi aussi bien une large gamme de gradient d'élution qu'une analyse isocratique est la détection évaporative par diffusion de lumière (DEDL). C'est ainsi que ce détecteur s'est avéré une alternative très concluante et de plus en plus utilisé que ce soit pour la séparation des lipides en général^[27-28] ou des TGs en particulier^[29-30]. Son principe repose sur la diffusion de lumière, après nébulisation de l'éluant et disparition du solvant par évaporation. L'effluent qui sort de la colonne est nébulisé par un courant gazeux qui permet l'évaporation du solvant. Une lumière visible et un photomultiplicateur permettent de mesurer l'intensité de la lumière diffusée par le brouillard de particules de solutés non volatils. Ce type de détecteur n'engendrant pas de dérive de la ligne de base pour les solvants volatils est compatible avec des gradients d'élution mais a l'inconvénient de ne pas détecter les composés très volatils et de ne pas donner des réponses linéaires, ce qui peut poser problème pour l'analyse quantitative. Cependant, de récentes études ont montré que dans une version de microchromatographie (avec un micronébuliseur adapté aux faibles débits) le DEDL offrait des réponses linéaires^[11, 31-33]. Le même type de réponse a été obtenu lors d'une étude faite sur les TGs de l'huile d'avocat (10-70µg)^[34]. Buchgraber et al.^[35] reportent qu'en optimisant soigneusement les paramètres de l'appareil et en établissant une

calibration correcte des conditions expérimentales, des résultats quantitatifs fiables peuvent être obtenus pour les TGs de beurre de cacao. Pour confirmer l'authenticité du beurre de cacao, Anklam et al.^[36] ont utilisé l'HPLC équipé du DEDL et avec une phase mobile, acétonitrile/dichlorométhane en gradient d'élution, ils ont obtenu d'excellentes séparations de TGs de graisses animales et végétales. Neff et al.^[37] ont utilisé une nouvelle version du DEDL, pour l'analyse quantitative des huiles de variétés de soja génétiquement modifiées. Les résultats du DEDL ont été comparés à ceux obtenus en FID. Ils ont démontré que le DEDL donne des résultats quantitatifs sans avoir besoin des facteurs de réponse des TGs. Il a été noté que le DEDL donnait des réponses linéaires pour des masses d'échantillon des TGs d'huile de soja entre 10-50 µg par injection en HPLC^[38].

Un détecteur semblant répondre aux exigences de détecteur universel est le détecteur à ionisation de flamme (FID). Cependant, il n'a été que très peu utilisé couplé à la chromatographie en phase liquide^[17]. Philips et al.^[39] ont utilisé le FID pour l'analyse quantitative des TGs du beurre de cacao, de l'huile de soja et d'olive. Ils ont observé de petites différences dans les réponses des espèces des TGs, ne nécessitant pas l'usage des facteurs correctifs de réponse. Ces résultats sont opposés à ceux de Numela et Satama^[23], qui ont trouvé une réponse variable pour différents TGs, alors que la variation était moindre avec le détecteur UV. Bien qu'une bonne sensibilité et une stabilité de la ligne de base aient été rapportées pour ce type de détecteur, le FID dédié à la chromatographie en phase liquide n'a pas été longuement commercialisé.

2-3 L'identification

Compte tenu de la diversité des TGs, les chromatogrammes fournis en CLPI sont assez complexes. Ainsi, plus il y a de pics et plus l'identification grâce à l'utilisation de témoins devient difficile car très peu de

TGs mixtes sont commercialisés et leur synthèse n'est pas facile. Pour pallier à cet inconvénient, plusieurs auteurs ont mis au point des méthodes permettant l'identification des pics obtenus lors d'analyses isocratiques ^[40-48]. On constate que les modalités de séparation des TGs sur colonnes de CLPI diffèrent profondément de celles utilisées en CPG, où les TGs sont principalement séparés en fonction des différences des masses moléculaires. En CPG, les groupes de CN différents ne coïncident pas, même sur colonnes de polarité moyenne. Ceci n'est pas le cas en RP-HPLC, où les composés sont séparés en fonction des effets combinés de longueurs de chaînes d'acides gras d'une espèce de TGs donnés et de leur degré d'insaturation, chaque double liaison réduisant la rétention. Les propriétés chromatographiques des molécules et la détermination de l'ordre d'élution ont été décrites par un nombre de paramètres tels que le nombre équivalent de chaîne (ECN), le nombre de partition (NP), ou encore le nombre de carbone théorique (TCN). Le concept de ECN a été introduit par Plattner et al. ^[49]. Il est défini par l'équation suivante : $ECN = CN - 2n$ où CN est la somme des atomes de carbone dans les résidus aliphatiques et n la somme des doubles liaisons par TG. En réalité ce concept correspond au vieux terme du nombre de partition (NP), défini par Litchfield ^[50]. Les molécules isomères ayant des valeurs identiques de ECN forment ce qu'on appelle des « paires critiques » difficiles à séparer. Mais les équipements modernes en HPLC permettent maintenant leur séparation. El-Hamdy et al. ^[51] ont introduit un terme spécifique, le TCN dont la valeur peut être déterminée à partir du rapport du logarithme du facteur de rétention (k) sur le nombre de carbone (CN) de TGs saturés, ou calculée à partir de l'équation suivante : $TCN = CN - a_1n_1 - a_2n_2 - a_3n_3$ où les coefficients a_1 , a_2 , a_3 peuvent être calculés par les analyses de régression multiples, et n_1 , n_2 , n_3 sont le nombre de doubles

liaisons attribuables respectivement aux résidus d'acides oléique, linoléique et linolénique.

Podlaha et Tôregård ^[52] ont développé un système graphique pour tenter d'identifier et de prédire les temps de rétention des TGs séparés en RP-HPLC. Ils ont démontré qu'il existe une relation linéaire entre le ECN et le CN des TGs. Ils ont trouvé des droites parallèles pour différentes séries homologues de TGs. Plusieurs auteurs ^[16,40] ont reporté une approche similaire dans des conditions de gradient d'élution, un programme d'élution non linéaire donnant une relation linéaire entre ECN et les temps de rétention.

Goiffon et al ^[53] pour identifier des espèces de TGs, ont décrit un schéma basé sur l'addition des énergies libres des solutions contenant des résidus acyl saturés et insaturés, ces travaux ayant été confirmés plus tard par Podalha et al. ^[52], ainsi que par Sempore et Bezard ^[54]. Une autre méthode d'identification consiste à compléter le mélange inconnu avec une huile de composition connue ^[55] ou comparer un profil à celui d'une huile précédemment analysée. Une étude comparative d'une cinquantaine d'huiles ou de corps gras d'origine biologique différente peut servir à cet effet ^[29]. Enfin, depuis quelques années, l'identification des TGs a été facilitée par l'introduction sur le marché du couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse.

III-CHROMATOGRAPHIE D'ARGENTATION

Cette méthode chromatographique utilise les propriétés de la combinaison des complexes réversibles des ions argent avec les électrons π des composés insaturés ^[56-70].

Une première technique consiste à imprégner des sels d'argent sur des plaques de silice, et à éluer les composés par une phase mobile de composition appropriée. Les ions Ag^+ formant un complexe avec les doubles liaisons, la séparation s'établit

selon le degré d'insaturation (les composés les plus insaturés étant les plus retenus). Une seconde technique consiste à imprégner de sels d'argent une colonne de gel de silice, le principe étant le même que précédemment. Cependant ceci a été peu utilisé car différents problèmes se sont posés: manque de reproductibilité des temps de rétention, élution des ions Ag^+ à l'adsorbant, sensibilité des ions Ag^+ à la lumière ou bien formation de couches d'argent sur les fenêtres de la cellule de détection^[71]. Pour pallier à ceci, Laakso et Christie^[72] ont utilisé une colonne échangeuse d'ions greffée de résidus d'acide sulfonique et recouverts d'ions Ag^+ . Cette technique a permis de bonnes séparations de TGs d'huiles diverses. Demirbükler^[73-75] en employant ce type de colonne en chromatographie super critique a obtenu de très belles séparations d'huiles végétales basées à la fois sur le nombre de carbone et de doubles liaisons. On peut enfin noter la technique adoptée par Vonach^[76] qui consiste à utiliser une colonne greffée C_{18} et une phase contenant des ions Ag^+ , alliant ainsi la rétention gouvernée par le volume hydrophobe et la complexation des solutés insaturés avec les ions Ag^+ de la phase mobile. Cependant, il a été montré que l'influence de la présence des ions Ag^+ n'est vraiment sensible qu'en utilisant le méthanol comme constituant de la phase mobile^[77]. En présence d'acétonitrile il y a une compétition d'interactions entre la complexation par les ions Ag^+ des doubles liaisons des solutés éthyléniques et celles de l'acétonitrile. Le bilan global est alors négligeable sur la séparation.

IV - ANALYSE STEREOSPECIFIQUE

L'analyse régiospécifique des TGs consiste en une hydrolyse enzymatique par la lipase pancréatique, après séparation du 2-monoacylglycérol et l'analyse en CPG du résidu acyle rattaché en position β ^[78-81]. C'est une méthode basée sur la formation, la dérivation et la séparation des diacyls-

sn- glycérols. Les premières analyses faites par Brockerhoff en 1965^[82] ont utilisé la phospholipase stéréospécifique A2, la phospholipase C, ainsi que la diacylglycérol kinase de *E. Coli* mais depuis la technique a été améliorée. La résolution des 1,2- et 2,3-diacyl-sn-glycérols qui est l'étape la plus délicate de l'analyse stéréospécifique, peut être réalisée par chromatographie en utilisant des dérivés 3,5-dinitrophényluréthane (DNPU) ou des diastéréoisomères sur colonne de silice. La phase stationnaire peut présenter une molécule chirale greffée sur support de gel de silice^[83-89]. De nombreux travaux menés sur l'analyse stéréospécifique ont permis de déterminer sans ambiguïté la répartition des AGs sur la molécule du glycérol^[90-107]. Cette méthode ne permet pas de discriminer la position sn-1 de sn-3 des acides gras sur le glycérol, ceci peut se faire selon la formule ci-après^[82,108-110].

$$[\text{AG en sn-1 et en sn-3}] = (3 \times [\text{AG intact sur le TG}] - [\text{AG en sn-2}] / 2)$$

Il est à noter que l'hydrolyse des liaisons externes des glycérides par la lipase pancréatique est peu spécifique. On observe cependant une certaine spécificité de la lipase sur des graisses et des huiles ayant soit des acides gras polyinsaturés, soit des acides gras à longue chaîne (acide docosahexaénoïque dans les TGs d'huile de poisson) ou alors des acides gras à courte chaîne comme l'acide butyrique des TGs de la graisse de lait des ruminants^[111].

V - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE SUPERCRITIQUE

En chromatographie en phase supercritique, les analyses peuvent être menées aussi bien avec les colonnes remplies de chromatographie liquide qu'avec des colonnes capillaires de CPG, voire même avec des colonnes échangeuses de cations ou de cations imprégnées de sels d'argent ou de potassium^[112-113]. La phase mobile utilisée

est un gaz comprimé au-delà de sa température et de sa pression critiques, c'est souvent le dioxyde de carbone à 90°C en programmation linéaire de pression (19.3 à 23.7 MPa.). Grâce à la faible viscosité et au très grand coefficient de diffusion des fluides supercritiques, les temps de rétention des solutés en SFC sont plus courts qu'en HPLC. Généralement, avec des colonnes de CPG l'ordre d'élution des espèces de TGs est gouverné par la polarité de la phase stationnaire, comme en CPG capillaire. Sur les phases stationnaires apolaires, les TGs sont séparés par classes ayant le même CN, alors que les phases polaires les séparent en fonction du CN et dans chaque groupe de CN en fonction du degré d'insaturation. L'usage d'une phase stationnaire polaire à 25% de cyanopropyl et 75% de méthylpolysiloxane a permis des séparations en fonction de la position des doubles liaisons dans la chaîne d'acides gras ^[114]. Pour les TGs renfermant l'acide α - ou γ -linoléique par exemple, l'isomère γ est élué avant l'isomère α . Beaucoup d'études menées ^[73,115-125] ont montré que même les TGs à longue chaîne et de haut poids moléculaire, peuvent être élués à température modérée (< 150°C), ce qui résout le problème de dégradation thermique lié souvent aux hautes températures de CPG. Ceci peut être un avantage pour l'analyse des huiles hautement insaturées, susceptibles de se décomposer à des hautes températures nécessaires à leur élution sur colonne CPG capillaire.

Comparativement à la HPLC, la SFC utilisée avec des colonnes remplies de chromatographie liquide, permet l'utilisation d'une large gamme de détecteurs, tel que le détecteur universel (FID), le DEDL ou encore l'UV à basse longueur d'onde ^[125]. D'une manière générale, l'efficacité en terme de nombre de plateaux théoriques est plus faible que celle obtenue en CPG mais la sélectivité est comparable à celle de la HPLC ^[126-128]. En modifiant la température en SFC avec

colonne remplie, on sépare mieux certaines paires critiques non séparées en NARP et inversement ^[16]. Cette approche s'appuie sur le calcul des valeurs partielles de ECN, pour chaque acide gras des TGs. En combinant ces valeurs partielles de ECN on peut estimer l'élution des complexes de TGs dans les huiles et les graisses naturelles.

L'avantage d'utiliser la SFC remplie pour l'analyse des TGs réside dans le fait que, compte tenu que les fluides supercritiques sont peu visqueux, cela permet de placer en série plusieurs colonnes. Cela conduit à des analyses efficaces (augmentation du nombre de plateaux) dans des temps plus courts qu'en HPLC.

VI - COUPLAGE HPLC / SM

La spectrométrie de masse a comme principe de produire des ions à partir d'un échantillon grâce à une source, de les séparer ensuite en fonction de leur rapport masse/charge dans un analyseur. Ainsi, les ions sortant de l'analyseur, viennent se décharger sur un détecteur qui en quantifiant leurs charges électriques, fournit les informations sur leur quantité. Le traitement du signal aboutit aux spectres de masse du composé.

Le développement du couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse est lié aux techniques d'ionisation à pression atmosphérique. Bien qu'il existe quelques applications de l'analyse des TGs avec une source d'ionisation electrospray (ESI) ^[129], la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ^[130] est bien plus couramment utilisée, l'ionisation des TGs non polaires étant facilitée en milieu non aqueux.

Les espèces principalement observées avec la source APCI sont les molécules protonées $[M+H]^+$ et des fragments $[M-RCOO]^+$ permettant l'élucidation de la structure des TGs. Dans le cas de l'utilisation de la source ESI, ce sont plutôt

des adduits avec le sodium ou le potassium qui sont observés, ne facilitant pas la reconnaissance structurale. La perte d'un groupement alkyl en position sn-1/3 est favorisée par rapport à la perte d'un fragment alkyl en position sn-2, ce qui conduit à des différences d'intensités des fragments $[M-RCOO]^+$. Des études récentes des intensités des différents fragments observés sur le spectre de masse obtenu en APCI montrent la possibilité de remonter à l'analyse régiospécifique des TGs, en particulier à la nature de la chaîne positionnée en sn-2^[131-139].

Combinant l'information de la masse moléculaire des solutés obtenue par la SM avec celle de la rétention chromatographique (IK ou ECL, diagrammes de Goiffon^[53]), le couplage Chromatographie-Spectrométrie de masse permet une identification relativement aisée des mélanges complexes que sont les corps gras.

VII. CONCLUSION

Les analyses des TGs de la matière grasse animale et végétale sont énormément facilitées grâce aux progrès réalisés en chromatographie, rendant ainsi disponibles des techniques de plus en plus performantes. Ces techniques comme la CPG, la SFC, l'HPLC et la chromatographie d'argentation utilisent des systèmes variés de détection tels que l'UV, le FID, le DEDL ou encore la SM. Le principal avantage de l'HPLC est la possibilité de séparer les TGs à température ambiante, épargnant ainsi le stress thermique aux TGs polyinsaturés à longue chaîne qui sont thermolabiles. Toutefois, les TGs à haut poids moléculaire ne sont pas facilement élués sur colonnes HPLC en raison de leur insolubilité dans les phases mobiles les plus courantes. Dans ce cas, la SFC est une alternative. Actuellement, la séparation et la quantification des TGs saturés et mono insaturés peuvent s'effectuer tant en CPG à haute température sur colonnes capillaires

à phases stationnaires phénylméthylsilicone polarisables, qu'en CLPI. Il s'avère que les deux techniques, la CPG et l'HPLC conviennent à l'analyse des mélanges complexes de TGs tels que les graisses animales, en l'occurrence la matière grasse du lait et d'huile de poisson. Il faut noter cependant que la résolution complète de certaines espèces moléculaires ne peut être obtenue ni par CPG capillaire, ni par CLPI, il est alors recommandé d'utiliser complémentirement ces deux techniques principales, une combinaison des résultats obtenus par deux méthodes chromatographiques s'avérant nécessaire pour une identification complète des espèces de TGs. La SFC parvient à éluer les TGs à température modérée, protégeant ainsi les polyinsaturés, et offre une résolution des TGs différente de la CPG ou la HPLC. La chromatographie d'argentation donne l'information sur le degré et la distribution de l'insaturation d'une part et sur la symétrie d'autre part. C'est une technique spécialement utilisée en combinaison avec d'autres méthodes de séparation.

Les lipides alimentaires étant absorbés principalement sous forme d'AGs libres ou de sn-2-monoacylglycérols, la caractérisation de la position des AGs sur le glycérol est primordiale sur le plan physiologique et nutritionnel. Par conséquent, pour une analyse structurale complète des triacyl-sn-glycérols, l'application des méthodes complémentaires comme l'analyse stéréospécifique par hydrolyse chimique ou enzymatique est fondamentale. Les informations obtenues peuvent servir à déceler les huiles frelatées, altérées, ou à élucider les mécanismes de biosynthèse des sn-TGs.

La spectrométrie de masse couplée la chromatographie en phase gazeuse d'une part et à la chromatographie liquide d'autre part, permettant une identification sans ambiguïté des composés s'avère être la

détection d'avenir pour toute analyse future de cette classe de composés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Maloumbi M-G., Héron S., Tchaplà A., *J.Soc.Ouest-Afr.Chim.* (2006) 021 ; 1-12 ;
- [2] Le Quéré J. L., Sémon E., *Analisis* (1998) 26 (3), M40-M41 ;
- [3] Aitzetmüller K., Oléag. Corps gras Lipides (1997) 4, 8-19;
- [4] Nikolava-Damyanova B., *Advances in lipid Methodoly- Four.Reversed-phase high-performance liquid chromatography:general principles and application to the analysis of fatty acids and triacylglycerols.* Edition W. W. Christie (1997) The oily Press Ayr Scotland ;
- [5] Rhodes H., Netting A. G., *J. Chromatogr.* (1998) 448, 135-143;
- [6] Tsimidou M., Macrae R., *J. Chromatogr. Sci.*, (1985) 23, 155-160;
- [7] Rohrschneider L., *Anal. Chem.* (1973) 45, 1241-1247 ;
- [8] Héron S., Tchaplà A., *Analisis* (1993) 21, 327-347 ;
- [9] Héron S., Tchaplà A., *Analisis* (1994) 22,114-126;
- [10] Maniongui C., Gresti J., Buguat M., Gauthier S., Bezard J., *J. Chromatogr.* (1991) 543, 81-103;
- [11] Salivaras E., McCurdy A. R., *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (1992) 28, 667-675;
- [12] Héron S., Tchaplà A., *J. Chromatogr.* (1991) 556, 219-234;
- [13] Héron S., Tchaplà A., *OCL* (1994) 1 (3), 219-228 ;
- [14] Dotson K. D., Jerrell J. P., Picciano M. F., Perkin E. G., *Lipids* (1992) 27, 933-936;
- [15] Unger K. K., *Packing and stationary phases in chromatographic techniques*, Ed 1990 Marcel Dekker, INC New York;
- [16] Héron S., Tchaplà A., *Chromatographia* (1993) 36, 11-18;
- [17] Lee D. S., Lee E. S., Kim H. J., Kim S.O., Kim K., *Anal. Chem. Acta* (2001) 429, 321-330;
- [18] Neff W. E., Adlof R. O., Konishi H., Weisleder D., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 70, 449-455 ;
- [19] Perona J. S., Ruiz-Guitierrez, J. *Liq. Chrom. Relat. Technol* (1999) 22, 1699-1714
- [20] Perona J. S., Barron J. R., Ruiz-Guitierrez J. *J. Chromatogr. B.* (1998) 706, 173-179;
- [21] Swe P. Z., Che Man. Y. B., Chazali H. M., *Food Chem.*(1995) 56, 181-186;
- [22] Lin J. T., Woodruff C. L., McKeon T. A., *J. Chromatogr. A.* (1997) 782, 41-48;
- [23] Numela K., V., Satama L.T., *J. Chromatogr.* (1988) 435, 139-148;
- [24] Rezanka T., Mares P., *J. Chromatogr.* (1991) 542, 145-159 ;
- [25] Redden P. R., Huanng Y.S., Lin X. R., Horrobin D. F., *J. Chromatogr* (1995) 694, 331-389;
- [26] Geeraert E., De Schepper D., *J. High Resol. Chromatogr.* (1983) 6, 123-132;
- [27] Christie W. W., Morrión W. R., *J. Chromatogr.* (1988) 436, 510-513;
- [28] Lutzke B. S., Braughler J. M., *J. Chromatogr* (1990) 31, 2127-2130;
- [29] Héron S., Tchaplà A., *Finger Prints of TG from oils and fat by HPLC isocratic elution and evaporative light scattering*, Ed 1994 Sedere, Alfortville France;
- [30] Palmer A. J., Palmer F. J., *J. Chromatogr* (1989) 465, 369-377;
- [31] Héron S., Tchaplà A., *J. Chromatogr A* (1999) 848, 95-104 ;
- [32] Burkow I. C., Henderson R. J., *J. Chromatogr* (1991) 552, 501-506 ;
- [33] Héron S., Tchaplà A., Chervet J. P., *Chromatographia* (2000) 51, 499-500 ;
- [34] Hierro M. T. G., Tomas M. C., Fernandez-Martin F., Santa-Maria G J. (1992) 607, 329-338;
- [35] Buchgraber M., Uberth F., Anklam E., *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* (2003) 105, 754-760
- [36] Anklam E. , Lipp M., Wagner B, (1996) 98, 55-59;
- [37] Neff W. E., List G. R., Byrdwell W. C., *J. Liq. Chrom.Relat. technol.* (1999) 22, 1649-1662;
- [38] Lee K.T., Jones K. C., Foglia T.A., *Chromatographia* (2002) 55, 197-201;
- [39] Phillips F. C., Erdahl W. L., Nadenicek J. D., *Lipids* (194) 19, 142-150 ;
- [40] Laakso P., Kallio H., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 70, 1161-1176;
- [41] Damiani P., Cossignari L., Sumonetti M. S., Santinelli F., *J. Chromatogr. Sci.* (2000) 38, 195-199;
- [42] Flor R. V., Hecking L. T., Martin B. D., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 70, 199-203;
- [43] Ruiz-Sala P., Hierro M. T. G., Martinez-Castro I., Santa-Maria, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 73, 283-293;
- [44] Lopez-Hernandez A., Torres C.F., Garcia H. S., Hill C. G., Jr., *J. Am. Oil Chem. Soc* (2004) 81, 743-747;

- [45] Hirano T., Takahashi K., *J. Chromatogr. Sci* (1995) 34, 341-348;
- [46] Martin-Carratla M. L., Liorens-Jorda C., Bereguer-Navarro V., Grane-Teruel N., *J. Food Chem.* (1999) 47, 3688-3692;
- [47] Gonzalez A. G., Pablos F., Artin M. J., Leon-Camcho M., Valderbro M. S., *Food Chem.* (2001) 73, 93-101;
- [48] Lee K. T., Jones K. C., Foglia T. A., *Chromatographia* (2002) 55, 197-201;
- [49] Plattner R. D., Spencer G. F., Kleinman R., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1977) 54, 511-515;
- [50] Litchfield C., *Analysis of triglycerides*. Academic Press 1977, New York;
- [51] El-Hamdy A. H., Spencer G. F., Kleinman R., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1981) 58, 867-872;
- [52] Podlaha O., Toregard B. J. *High Chromatogr.* (1982) 435, 553-558;
- [53] Goiffon J. P., Reminiac C., Olle M., *Rev. Fr. Corps Gras* (1981) 28, 167-170;
- [54] Sempore G., Bezard J., *Chromatographia* (1986) 366, 261-282;
- [55] Héron S., Lesellier E., Tchaplal A., *J. Liq. Chrom.* (1995) 18, 599-611;
- [56] Nikolova-Damyanova B., Christie W. W., Herslöf B., *J. Chromatogr. A* (1996) 749, 47-54;
- [57] Christie W. W., *Chromatographia* (1988) 454, 273-284;
- [58] Robinson N. P., McGibbon A. K. H., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1998) 75(8), 993-999;
- [59] Kempainen A., Kalo P., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1998) 75(2), 91-99;
- [60] Rickert R., Steinhart H., *J. High Resol. Chromatogr.* (1999) 22 (3), 144-148;
- [61] Correa R. A., Ferraz V., Medvedovici A., Sandra P., Cerne K., David F., *J. Chromatogr. A* (1999) 848, 83-93;
- [62] Christie W. W., *Prog. Lipid Res.* (1994) 33, 9-18;
- [63] Christie W. W., Nikolova-Damyanova B., *J. Chromatogr. B* (1995) 671, 197-222;
- [64] Laakso P., Christie W. W., Petersen J., *Lipids* (1990) 25, 284-291;
- [65] Macher M. B., Holmqvist A., *J. Sep. Sci* (2001) 24, 179-185;
- [66] Neff W. E., Adlof R. O., List G. R., El-Agaimy M., *J. Liq. Chromatogr.* (1994) 17, 3951-3968;
- [67] Adlof R. O., *J. High Resol. Chromatogr.* (1995) 18, 105-107;
- [68] Adlof R. O., *J. Agric. Food Chem.* (2003) 51, 2096-2099;
- [69] Adlof R. O., Menzel A., Dorovska-Taran V., *J. Chromatogr. A* (2002) 953, 293-297 ;
- [70] Février P., Binet A., Dufossé L., Grée R., *J. Chromatogr. A* (2001) 923, 53-57;
- [71] Aitzetmüller K., Xin Y., Werner G., Gronheim M., *J. Chromatogr.*, (1992) 603, 165-173;
- [72] Laakso P., Christie W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1991) 68, 213-223;
- [73] Demirburker M., Blomberg L. G., *J. Chromatogr.* (1990) 28, 67-72;
- [74] Demirburker M., Blomberg L. G., *J. Chromatogr.* (1991) 550, 765-774;
- [75] Demirburker M., Blomberg L. G., *J. Chromatogr.* (1992) 600, 358-363;
- [76] Vonach B., Schomburg G., *J. Chromatogr.* (1978) 149-430;
- [77] Thevenon-Emeric G., Tchaplal A., Martin M., *J. Chromatogr.* (1991) 550, 267-283;
- [78] Santinelli F., Damiani P., Christie W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1990) 69, 552-556;
- [79] Maurin R., Fellat-Zarrouck K., Ksir M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1992) 69, 141-145 ;
- [80] Martin J. C., Bougnoux, P., Antoine J. M., Lanson M., Couet G., *Lipids* (1993) 28, 637-643 ;
- [81] Damiani P., Santinelli F., Simonetti M. S., Castellini, M., Rosi M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1994) 71, 1157-1162;
- [82] Brockerhoff H. A., *J. Lipid Res.*, (1965) 6, 10-15;
- [83] Damiani P., Rosi M., Santinelli F., Castellini, M., L. Cossignani, Simonetti M. S., *Ital. J. Food Sci.* (1994) 6, 113-122;
- [84] Takagi T., Ando Y., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* (1991) 40, 288-292;
- [85] Takagi T., Ando Y., *Lipids* (1991) 26, 542-547;
- [86] Takagi T., Ando Y., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1995) 72, 1203-1206;
- [87] Harp T. K., Hammond E. G., *Lipids* (1998) 33, 209-216;
- [88] Takagi T., Suzuki J., *J. Chromatogr.* (1990) 519, 237-243;
- [89] Sempore B. G., Bezard J., *J. Chromatogr.* (1991) 547, 89-103
- [90] Laakso P., Christie W. W., *Lipids* (1990) 25, 349-353;
- [91] Itabashi Y., Kukusis A., Marai L., Takagi T., *J. Lipid Res.* (1990) 31, 1711-1717 ;
- [92] Aubert-Mammou C., Mangiozzi M., Soulier J., *OCL* (1996) 3(1), 65-69 ;
- [93] Kusaka T., Ishihara S., Sakaido M., Mifune A., Nakano Y., Tsuda K., Ikeda M., Nakano H., *J. Chromatogr. A* (1996) 730, 1-7 ;

- [94] Damiani P., Cossignani L., Simonetti M. S., Campii B., Favretto L., Favretto L.G., *J. Chromatogr. A* (1997) 758, 110-115 ;
- [95] Itabashi Y., Myher J., Kuksis A., *J. Chromatogr. A* (2000) 893, 261-279 ;
- [96] Wajda-Dubois J.P., Farines M., Soulier J., Cousse H., *OCL* (1996) 3(2), 137-139 ;
- [97] Grondin I., Smadja J., Soulier J., *OCL* (1997) 4(4) 295-301;
- [98] Kosugi Y., Oshima A., Koike S., Fukatsu M., Minami K., Miyake Y., Masui K., *J. Am. Oil Chem. Soc* (2004) 81(3), 235-239;
- [99] Kemppinen A., Kalo P., *J. Am. Oil Chem. Soc* (1998) 75 (2), 91-99;
- [100] Reske J., Siebrecht J., Hazebrock J., *J. Am. Oil Chem. Soc* (1997) 74 (8), 989- 998
- [101] Foglia T. A., Conkerton E. J., Sonnet P. E., *J. Am. Oil Chem. Soc* (1995) 72 (11), 1275-1279;
- [102] Iwasaki Y., Yasui M., Ishikawa T., Irimescu R., Hata K., Yamane T., *J. Chromatogr. A* (2001) 905, 111-118;
- [103] Grondin I., Smadja J., Soulier J., *OCL* (1997) 4 (6), 459-463;
- [104] Ando Y., Ta T., Matsuhira Y., Yazawa K., *J. Am. Oil Chem. Soc* (1996) 73 (4), 483-487;
- [105] Damiani P., Cossignani L., Simonetti M. S., Santinelli L., Monotti M., *J. Am. Oil Chem. Soc* (1997) 74 (48), 927-933;
- [106] Arcos J. A., Garcia H. S., Hill C. G. Jr., *J. Am. Oil Chem. Soc* (2000) 77 (5), 507-512
- [107] Blaise P., Wolf R., Farines M., *OCL* (1997) 4 (2), 135-141;
- [108] Redden P. R., Lin X., Fahey J., Horrobin D. F., *J. Chromatogr. A* (1995) 704, 99-111;
- [109] Kallio H., Laakso P., *J. Chromatogr. A* (1990) 518, 69-75;
- [110] Toschi T. G., Christie W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1990) 69, 552-556;
- [111] Ando Y., Nishimura K., Aoyanagi N., Takagi T., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1992) 69, 417-424;
- [112] Lubke M., *Analisis* (1991) 19, 323-343;
- [113] Demirburker M., Hagglund I., Blomberg, *J. Chromatogr.* (1992) 605, 263-267;
- [114] Mares P., Husek P., *J. Chromatogr.* (1985) 350, 87-103;
- [115] Laakso P., *Advances in lipid methodology-one, Supercritical fluid chromatography of lipids.* Edition W. W. Christie, The Oily Press 1992, Ayr Scotland ;
- [116] Huopalahti R., Laakso P., Saaristo J., Linko R., Kallio H., *J. High Resol.Chromatogr.* (1988) 11, 899-901;
- [117] Kallio H., Laakso P., *J. Chromatogr.* (1990) 518, 69-75;
- [118] Baiocchi C., Saini G., Cocito C., Giacosa D., Roggero M. A., Marengo E., Favelle M., *Chromatographia* (1993) 37, 525-533;
- [119] Manninen P., Laakso P., Kallio H., *Lipids* (1995) 30, 665-671;
- [120] Arraud P., Thiebaut D., Caude M., Rosset M., Lafosse M., *J. Chromatogr. Sci.* (1987) 25, 395-398;
- [121] Perrin J. L., Prevot A., *Rev. Fr. Corps gras* (1988) 35, 485-494;
- [122] Taylor L. T., Chang H. C. K., *J. Chromatogr. Sci.* (1990) 28, 357-366;
- [123] Kallio H., Johansson A., Oksman P., *J. Agric.Food Chem.* (1991) 39, 1752-1756;
- [124] Demirburker M., Anderson P. E., Blomberg L. G., *J. Microcolumn Sep.* (1993) 5, 141-147 ;
- [125] Sandra P., Medvedovici A., Zaho Y., David F., *J. Chromatogr.* (2002) 974, 231-241;
- [126] Christie W. W., *Gas chromatography and lipids- A practical guide*, (1989) the oils press, Ayr, Scotland ;
- [127] Funada Y., Hirata, *J. Chromatogr. A* (1997) 764, 301-325;
- [128] Lesellier E., Tchaplal A., *Anal. Chem.* (1999) 71, 5372-5379;
- [129] Laakso P., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2002) 104, 43-49;
- [130] Castilho P. C., Céu Costa M., Rodrigues A., Branco P. C., Costa M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2004) 81(10), 913-919;
- [131] Aichlholz R., Spitzer V., Lorbeer E., *J. Chromatogr. A* (1997) 787, 181-194;
- [132] Kallio H., Currie G., *Lipids* (1993) 28 (23) 207-215;
- [133] Myher J. J., Kuksis A., Marai L., Sandra P., *J. Chromatogr.* (1988) 452, 93-118;
- [134] Segall S. D., Artz W. E., Raslan D. S., Ferraz V. P., Takahashi J. A., *J. Am. Oil Chem. Soc* (2004) 81(2), 143-149;
- [135] Soupas L., Tuntunen L., Saynajoki S., Lampi A-M., Piironen V., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2004) 81(2), 135-141;
- [136] Kallio H. K., Yli-Jokipii J. P., Kurvinen O. S., Tahvonen R., *J. Agric. Food Chem.* (2001) 49, 3363-3369;
- [137] Neff W. E., Byrdwell W.C., Steidley K. R., List G. R., Snowden G., *J. Liq.Chromatogr. Rel. Technol.* (2002) 25, 985-998;
- [138] Byrdwell W. C., *Lipids* (2001) 36, 327-346;
- [139] Jakab A., Heberger K., *J. Chromatogr. A* (2002) 976, 255-263