

Article de recherche

Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matière grasse de produits laitiers et pour l'estérification subséquente des acides gras*

R.L. Wolff et R.J. Fabien**

Unité de biochimie-biotechnologie de l'ITERG, Laboratoire de lipochimie alimentaire, Université de Bordeaux I, allée des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

(reçu le 4-12-1987, accepté le 26-8-1988)

Résumé — Des études complémentaires sur la méthode d'extraction de la matière grasse par l'hexane/isopropanol (3:2, V/V) couplée à une filtration sur colonne de célite- Na_2SO_4 proposée récemment par Wolff et Castera-Rossignol (1987) ont été réalisées. En utilisant des huiles végétales comme modèle, nous montrons que cette méthode ne provoque ni altération des acides gras polyinsaturés, ni hydrolyse des glycérides. Deux méthodes de préparation d'esters isopropyliques (EIP) des acides gras de la matière grasse ainsi extraite sont proposées. Une première méthode par catalyse acide (H_2SO_4 , 100°C, 1 h) permet de préparer les EIP des acides gras totaux de la matière grasse sans perte des esters les plus courts et sans altération des acides gras contenant jusqu'à 3 doubles liaisons. Les acides gras des lipides les plus couramment rencontrés dans les matières grasses de produits laitiers (glycérides, acides gras libres, lécithines) sont transformés à 97,5% en EIP. Ceux-ci ont une composition représentative de la totalité des acides gras. Une seconde méthode, applicable aux acides gras estérifiés seulement, permet de préparer les EIP en présence d'isopropylate de sodium, en 2 min et à température ambiante. Le rendement en EIP est de l'ordre de 95%, et ceux-ci ont une composition représentative de la composition des acides gras estérifiés de la matière grasse. Les analyses des EIP par chromatographie en phase gazeuse se font dans des conditions très voisines de celles des esters méthyliques. Toutefois, des considérations théoriques sur les facteurs de réponse dans le détecteur à ionisation de flamme semblent indiquer que les pourcentages des aires des pics des EIP sont plus proches des pourcentages en poids des acides gras que ne le sont les pourcentages des aires des pics d'esters méthyliques. Des exemples d'application de la méthode d'extraction de la matière grasse et des méthodes de préparation des EIP sont donnés pour des pâtes à tartiner à teneur réduite en lipides.

extraction — matière grasse — esters isopropyliques — chromatographie en phase gazeuse — facteurs de réponse — pâtes à tartiner

* Cette étude fait suite à une publication antérieure (Wolff R.L. & Castera-Rossignol A.F.M. (1987) Mise au point et évaluation d'une méthode d'extraction de la matière grasse de fromage de type Emmental. *Rev. Fr. Corps Gras* 34, 123-132) et a fait l'objet d'un contrat ACTIA n°85-14.

** Bénéficiaire d'une allocation d'études de l'ITERG dans le cadre d'un DEA Science des Aliments à l'Université de Bordeaux.

Summary — The use of isopropanol for fat extraction from dairy products and for the subsequent esterification of fatty acids. Complementary studies have been made on the recent method proposed to extract fat with hexane/isopropanol (3:2, V/V) and filtration on a Celite- Na_2SO_4 column (Wolff et Castera-Rossignol, 1987). Using plant oils as models, we show that this method does not either alter polyunsaturated fatty acids or hydrolyse glycerides. Two methods for the subsequent preparation of isopropyl esters (IPE) have been optimized. With acid-catalyzed esterification (H_2SO_4 , 100°C, 1 h), IPE of total fatty acids from the fat extract are obtained without loss of the shorter esters and without alteration of polyunsaturated fatty acids (up to 3 double bonds). Fatty acids from the main components of dairy products (glycerides, free fatty acids, lecithins) are esterified up to 97.5%. The composition of IPE prepared with this method is representative of total fatty acid composition. IPE may also be prepared with sodium isopropylate in 2 min at ambient temperature with a rate of about 95%. The second method is applicable only to esterified fatty acids. These IPE have a composition representative of the esterified fatty acids. Gas liquid chromatography of IPE can be performed in conditions similar to those used for methyl esters. Taking into account the flame ionization detector response, it would appear that IPE may present an advantage over methyl esters in that peak area percentages of IPE are more closely related to the true fatty acid weight percentages than peak area percentages of methyl esters. These methods have been used to analyse total fatty acids of fat from low calorie spreads (plant oil/butter spreads).

fat — extraction — isopropyl esters — gas liquid chromatography — response factor — low calorie spread

Introduction

Dans une étude récente, Wolff et Castera-Rossignol (1987) ont proposé d'associer le mélange d'extraction hexane/isopropanol (3:2, V/V) (mélange HIP) à une filtration sur colonne mixte de célite- Na_2SO_4 pour extraire la matière grasse de fromages à pâte cuite pressée (méthode WCR). Le mélange HIP, mis au point initialement sur des tissus biologiques par Hara et Radin (1978), présente l'avantage sur le mélange chloroforme/méthanol (2:1, V/V) de Folch *et al.* (1957) d'extraire moins de composés non lipidiques (Hara et Radin, 1978; Radin, 1981; Wolff et Castera-Rossignol, 1987). De ce fait, une partition entre phases organique et aqueuse n'est pas toujours nécessaire et la méthode WCR appliquée à un échantillon d'Emmental permet d'en extraire quantitativement et sélectivement la matière grasse. Celle-ci renferme les composés lipidiques qui auraient pu être perdus dans une phase hydro-alcoolique

telle que la phase supérieure de Folch *et al.* (1957) et est pratiquement dépourvue de protéines (Wolff et Castera-Rossignol, 1987).

L'extraction et la filtration étant réalisées à température ambiante, sans acide ni base forts, il y a tout lieu de penser que la méthode WCR n'est pas altérante. Cela semble ne pas être le cas de la plupart des méthodes couramment utilisées pour l'extraction de la matière grasse des produits laitiers, qui font souvent appel à des acides ou bases forts ainsi qu'à des températures élevées (Groupe de travail du CNERNA, 1972; Kuzdzal-Savoie et Lebon, 1971; Wolff et Castera-Rossignol, 1987). De plus, la présence d'isopropanol dans le mélange d'extraction a été mise à profit pour préparer les esters isopropylés (EIP) des acides gras (AG) totaux de la matière grasse en ajoutant directement un catalyseur acide (H_2SO_4) à une partie aliquote de la solution de matière grasse (Wolff et Castera-Rossignol, 1987). Ce procédé, qui évite l'évaporation

préalable des solvants, devrait permettre de conserver les AG volatils. Toutefois, dans l'étude citée, l'aspect quantitatif de la réaction d'estérification par catalyse acide des AG n'a pas été étudié. Poursuivant ce travail, nous présentons des résultats montrant que la méthode WCR n'altère pas les AG polyinsaturés (jusqu'à 3 doubles liaisons), et des données indiquant que l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des AG sous forme d'EIP peut être une alternative intéressante à leur analyse sous forme d'esters méthyliques (EM). En outre, un procédé rapide de préparation des EIP d'AG en milieu basique est proposé, et des exemples d'application à des pâtes à tartiner à teneur réduite en matière grasse (mélanges de babeurre, de beurre ou d'autres dérivés du beurre, et d'huiles végétales) sont donnés.

Matériel et Méthodes

Solvants, réactifs chimiques et échantillons

Eau permutée; hexane : Rectapur, redistillé; isopropanol : pureté > 99,5%; tétrahydrofurane : Rectapur; sulfate de sodium : pureté > 99,5%; célite 545 (Prolabo); mélanges pondérés d'EM purs (NU-Chek Prep, Elysean, Minnetonka); échantillons de lipides purs (99%) (Sigma, St. Louis, Missouri); huile de lin désodorisée, huile de coprah; échantillons d'Emmental fournis par l'Institut Technique du Gruyère (ITG); pâtes à tartiner à teneur réduite en lipides du commerce.

Extraction de la matière grasse

Les échantillons congelés de fromage sont râpés et environ 2 g sont pesés avec précision. Après addition de 25 ml du mélange HIP, le fromage est broyé à l'aide d'un appareil Ultraturax et la suspension est agitée pendant 15 min. Puis le mélange est transvasé en tête d'une colonne constituée d'une couche inférieure de Na_2SO_4 anhydre et d'une couche supérieure de célite (3 g environ de chaque). L'élution est poursuivie jusqu'à obtention d'un volume de

100 ml d'extrait. Pour les pâtes à tartiner, 2 g de Na_2SO_4 sont ajoutés à la suspension après dispersion à l'Ultraturax.

Mesures d'acidité

Les mesures d'acidité sont effectuées sur 50 ml de solution de matière grasse dans le mélange HIP, par titration à l'aide d'une solution éthanolique de potasse (0,04M) en présence de phénolphthaléine.

Préparation des esters d'acides gras

Les réactions d'estérification se font dans des tubes en verre Pyrex (100 x 18 mm) munis d'un col à vis dont le bord supérieur est rodé. Les bouchons sont munis d'une pastille souple recouverte de Teflon.

Préparation des EIP par catalyse acide

Un mélange de 0,2 ml de H_2SO_4 (36N) et de 1,3 ml d'isopropanol est ajouté à 2 ml d'extrait lipidique. Le mélange, éventuellement homogénéisé à l'aide d'isopropanol, est porté 1 h à 100°C (Wolff et Castera-Rossignol, 1987). Après refroidissement, un déphasage est effectué avec 5 ml d'eau. La phase supérieure est extraite 2 fois supplémentaires avec un volume d'hexane égal au volume de phase supérieure prélevée (environ 1 ml). Les phases "hexaniques" sont rassemblées et conservées à -20°C.

Préparation des EIP en milieu basique

Une solution d'isopropylate de sodium (0,22 M) est obtenue en dissolvant 0,5 g de sodium dans 100 ml du mélange isopropanol/tétrahydrofurane (80:20, V/V) à 40°C. Après avoir évaporé les solvants de 2 ml d'extrait lipidique, on ajoute successivement 0,2 ml de la solution d'isopropylate de sodium, 0,8 ml d'isopropanol et 1,5 ml d'hexane. Un précipité se forme. Après 2 min, le mélange est acidifié avec HCl 2N, jusqu'à disparition de la turbidité. Un déphasage avec 5 ml d'eau et 2 extractions à l'hexane sont effectués comme précédemment.

Transestérification par le trifluorure de bore méthanolique (Morrison et Smith, 1964)

Celle-ci peut se faire en présence de gel de silice lorsque les composés sont séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) et recueillis par grattage; 1 ml d'une solution à

10% de BF_3 dans du méthanol (Fluka, Buchs, Suisse) est ajouté au gel ou à une partie aliquote de la solution de lipides dont les solvants ont été évaporés. Le mélange est porté à 90°C pendant 45 min. Après refroidissement, on ajoute 1 ml d'eau et les EM sont extraits avec 3 fois 2 ml d'hexane.

Esterification par le méthylate de sodium (Christie, 1982)

Les solvants de 2 ml d'extrait lipidique sont évaporés et les lipides redissous dans 2 ml d'une solution (0,5 M) de méthylate de sodium dans du méthanol. Le mélange est placé à 50°C pendant 10 min, puis 0,1 ml d'acide acétique concentré est ajouté, suivi de 5 ml d'eau, et les esters sont extraits 3 fois avec 1 ml d'hexane.

Analyse des esters d'acides gras par CPG

La majorité des analyses des EM et des EIP par CPG a été effectuée dans un appareil Carlo Erba HRGC 4160, équipé d'une colonne capillaire CP-Sil 88 (Chrompack, Middelburg, Hollande), longueur : 50 m, diamètre intérieur : 0,22 mm; gaz vecteur : hydrogène (1,3 bar); injecteur : mode diviseur, fuite 1/40^e; température : 250°C; détecteur à ionisation de flamme : 250°C; température du four : isotherme à 75°C pendant 4 min, puis programmation de température de 75°C à 175°C à une vitesse de 7,5°C/min, et isotherme à 175°C pendant 20 min, ou isotherme à 175°C pendant toute l'analyse. Quelques analyses ont été réalisées sur colonne capillaire CP-Wax 52 CB (Chrompack), longueur : 25 m, diamètre intérieur : 0,22 mm; gaz vecteur : hydrogène (0,8 bar); injecteur et détecteur comme précédemment. Analyses en isotherme à 195 ou 197°C. Les calculs ont été effectués à l'aide d'un intégrateur Shimadzu CR2A.

Chromatographie sur couche mince

Les lipides sont séparés par CCM de silicagel à l'aide de plaques étalées au laboratoire (Kieselgel H 60 Merck, Darmstadt, RFA) ou de plaques préétalées (Pre-coated TLC plates, Silicagel 60, Merck). Le mélange hexane/oxyde d'éthyle/acide acétique (90:10:1, V/V/V) est utilisé pour fractionner les lipides apolaires. La révélation des composés est faite par vaporisation d'une solution de H_2SO_4 à 50% dans l'eau et carbonisation à 180°C. Si

l'analyse ultérieure des lipides est nécessaire, une vaporisation avec une solution éthanolique à 0,2% (Pds/V) de 2',7'-dichlorofluorescéine est effectuée et la révélation faite sous lumière UV (254 nm).

Résultats et discussion

Transestérification des acides gras

Transestérification catalysée par H_2SO_4

Optimisation de l'extraction des EIP. Le nombre d'extractions et le volume d'eau nécessaires pour l'obtention quantitative des EIP ont été déterminés à l'aide d'un extrait de matière grasse d'Emmental. La quantité d'EIP dans chaque fraction successive d'hexane-isopropanol a été déterminée par CPG après addition d'un étalon externe, le nonanoate de méthyle. Pour 4 extractions successives, la 1^{re} extraction entraîne de 85 à 90% des EIP, la 2^e de 9 à 13%, la 3^e de 1 à 2% et la 4^e de 0,2 à 0,5%. La 3^e extraction est indispensable pour extraire la totalité des EIP de l'acide butyrique, car ceux-ci sont plus solubles dans la phase hydro-alcoolique que les autres EIP. En revanche, il n'est pas utile d'effectuer la 4^e extraction. L'analyse par CPG du 4^e extrait à l'hexane obtenu après déphasage par 1,5, 3 ou 5 ml d'eau a montré que 5 ml d'eau étaient nécessaires pour extraire quantitativement les EIP formés. Le déphasage, rapide et net, ne nécessite pas de centrifugation.

Esterification des acides gras de différentes classes de lipides. Des échantillons d'acide oléique, de mono-oléine, de dioléine, de trioléine, d'oléate de cholestérol, de phosphatidylcholine (lécithine d'œuf) et de sphingomyéline (cerveau de bœuf) sont traités dans les conditions décrites de catalyse acide. Le fractionnement par CCM des produits de la réaction (Fig. 1) montre que les glycérides et la

phosphatidylcholine disparaissent totalement. Il en est de même de la sphingomyéline, mais celle-ci donne naissance à de nombreux composés ninhydrine-positifs; quant à l'oléate de cholestérol, il ne réagit que très partiellement (résultats non montrés). En plus des EIP formés, on note l'apparition (ou la persistance, dans le cas de l'acide oléique) d'AG libres en faible quantité.

Rendement de l'estérification et représentativité des esters formés. Les EIP et les AG libres obtenus après estérification par catalyse acide de la trioléine sont fractionnés par CCM. Après grattage des bandes de gel renfermant les EIP et les AG libres, une quantité connue d'acide stéarique est ajoutée au gel contenant les AG libres et le mélange est estérifié par le BF_3 méthanolique (Morrison et Smith, 1964). De la même façon, une quantité

connue d'EM de l'acide stéarique est ajoutée au gel contenant les EIP. Dans ce dernier cas, les esters sont extraits par de l'hexane après mise en suspension du gel dans 1 ml du mélange eau/méthanol/acide acétique (10:10:1, V/V/V) (Wolff *et al.*, 1985). Après analyse par CPG des 2 fractions, nous avons calculé que les AG libres représentent 2,5% des produits de la réaction.

Après transestérification d'une huile de coprah, une partie aliquote du milieu réactionnel est soumise à une CCM de silica-gel. Les bandes de gel renfermant les EIP et les AG libres sont récupérées; les EIP sont extraits et les AG libres transformés en EM en présence de BF_3 méthanolique. Les EIP et les EM sont ensuite analysés par CPG. Les compositions obtenues, indiquées dans le Tableau I, montrent que les AG libres formés ont une composition identique à celle des EIP avant et après

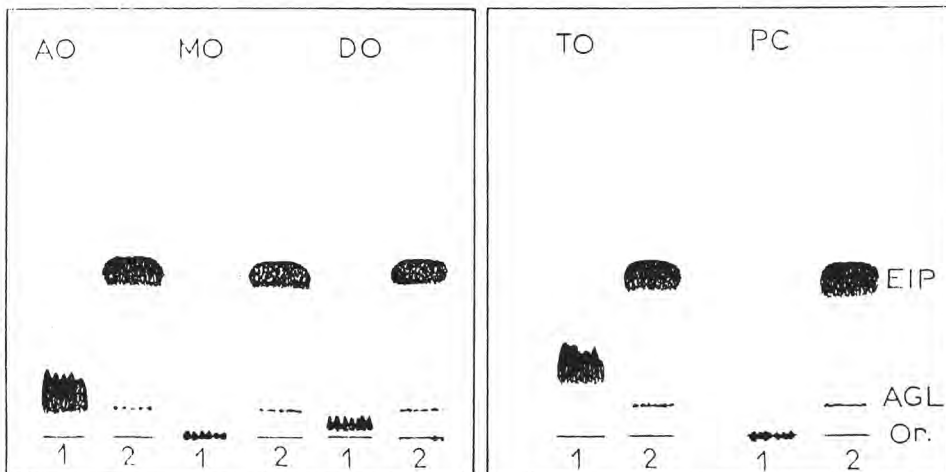


Fig. 1. CCM des témoins (1) et des produits (2) de la réaction de transestérification par l'isopropanol de différents échantillons de lipides purs en présence de H_2SO_4 . AO : acide oléique; MO : mono-oléine; DO : dioléine; TO : trioléine; PC : phosphatidylcholine; AGL : acides gras libres; EIP : esters isopropyliques; Or : origine.

séparation par CCM. L'hydrolyse des EIP et des glycérides n'est donc pas sélective et la composition des EIP est représentative de la composition réelle en AG de la matière grasse analysée.

Effet des conditions opératoires sur les acides gras polyinsaturés. Sa forte concentration en acide α -linoléique (18:3 (n-3)) fait de l'huile de lin un bon modèle pour étudier les effets des modes opératoires sur les AG polyinsaturés. Des EIP sont préparés par catalyse acide avec H_2SO_4 à partir d'huile de lin, soit avant, soit après passage sur la colonne de célite- Na_2SO_4 , puis analysés par CPG. Aucune différence dans les compositions en AG de l'huile n'est notée (résultats non montrés). Des mesures d'acidité effectuées sur des solvants purs élués d'une colonne de célite- Na_2SO_4 ont permis de vérifier que la colonne ne relargue pas de produits acides. De même, l'acidité d'une huile reste inchangée après passage sur la colonne (résultats non montrés). Cela indique que les composés de l'huile ne

sont pas hydrolysés lors de l'élution.

Les conditions de préparation des EIP pouvant être considérées comme drastiques, nous avons recherché, en utilisant de l'huile de lin comme modèle, si elles pouvaient entraîner une dégradation des AG polyinsaturés. La composition en AG des EIP obtenus par catalyse acide est comparée dans le Tableau II aux compositions en EIP et en EM obtenus par des méthodes de transestérification plus douces : méthodes à l'isopropylate de sodium (étudiée plus loin) et au méthylate de sodium (Christie, 1982). L'examen de ce tableau permet de conclure que la méthode de transestérification en présence de H_2SO_4 n'est pas dégradante.

De plus, l'utilisation d'une colonne capillaire capable de séparer les isomères de configuration *trans* de l'acide α -linoléique, sans chevauchement avec les acides 20:0 et 20:1, permet de constater que la méthode proposée ne provoque pas d'isomérisation *cis-trans*. Dans la Figure 2 sont comparés les chromatogrammes obtenus par CPG sur colonne

Tableau I. Comparaison des compositions en AG des EIP et des AG libres après transestérification d'une huile de coprah en présence de H_2SO_4 . Les EIP sont analysés avant et après séparation par CCM. Les AG libres, séparés par CCM, ont été méthylés en présence de BF_3 méthanolique.

Nature de l'acide gras	EIP avant CCM	Composition ^a EIP après CCM	EM des AG après CCM
8:0	10,17 $\pm$ 0,18 ^b	10,18 $\pm$ 0,15	10,62 $\pm$ 0,30
10:0	6,95 $\pm$ 0,11	7 $\pm$ 0,07	6,99 $\pm$ 0,12
12:0	52,07 $\pm$ 0,30	52,22 $\pm$ 0,13	51,89 $\pm$ 0,37
14:0	18,01 $\pm$ 0,05	18,09 $\pm$ 0,13	17,23 $\pm$ 0,24
16:0	7,93 $\pm$ 0,10	7,79 $\pm$ 0,10	8,56 $\pm$ 0,12
18:0	1,87 $\pm$ 0,06	1,81 $\pm$ 0,03	1,86 $\pm$ 0,10
18:1	3 $\pm$ 0,14	2,91 $\pm$ 0,02	2,85 $\pm$ 0,12

^a les résultats sont exprimés en pourcentages en poids d'acides gras, après correction des surfaces des pics par les facteurs indiqués dans le Tableau III et normalisation à 100%; ^b moyenne de 3 analyses et écart type.

Tableau II. Composition des esters obtenus par différentes méthodes d'estérification des AG d'huile de lin.

Acides gras	EIP (H ⁺) ^a (%) (n=5) ^b	EIP (IPrO ⁻) (%) (n=5)	EM (MO ⁻) (%) (n=3)
16:0	5,75 ± 0,04 ^c	5,79 ± 0,07	5,57 ± 0,11
18:0	3,84 ± 0,04	3,83 ± 0,04	3,70 ± 0,01
18:1 (n-9)	17,19 ± 0,11	17,23 ± 0,04	17,20 ± 0,13
18:1 (n-7)	0,73 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,74 ± 0,01
18:2 (n-6)	18,12 ± 0,01	18,16 ± 0,05	18,15 ± 0,04
18:3 (n-3)	54,37 ± 0,13	54,27 ± 0,22	54,64 ± 0,03

^a H⁺ : transestérification catalysée par H₂SO₄; IPrO⁻ : transestérification en milieu basique (isopropylate de sodium); MO⁻ : transestérification en milieu basique (méthylate de sodium); ^b : nombre d'analyses; ^c : moyenne et écart type.

de CP-Wax 52 des EM d'AG d'huile de lin obtenus par la méthode au méthylate de sodium et des EIP préparés à partir de la même huile par catalyse acide. L'huile de lin utilisée, désodorisée, renferme un faible pourcentage d'isomères *trans* de l'acide α -linoléique (épaulements a et c, et pic d sur la Figure 2); l'isomère *t,c,c* représente le même pourcentage (1,4%) du total des isomères de l'acide α -linoléique, aussi bien dans les EM que dans les EIP.

On notera au passage qu'un incrément de 2°C de la température de la colonne est suffisant pour obtenir des temps de rétention des EIP égaux à ceux des EM (Fig. 2).

Transestérification à l'isopropylate de sodium

Des essais de transestérification en milieu basique ont été réalisés sur les mêmes échantillons de lipides purs que ceux utilisés pour la transestérification par catalyse acide. Après 2 min à 20-25°C, l'analyse par CCM révèle l'absence des glycérides de départ dans le milieu réactionnel (résultats non montrés, analogues à ceux de la

Fig. 1). Des dosages par CPG, utilisant la méthode du standard externe, indiquent qu'il se forme de 3 à 8% d'AG libres pendant la réaction de transestérification en milieu basique. Une étude sur l'huile de tournesol nous a permis de conclure que les AG libres et les EIP formés ont une composition identique, et que la composition des EIP est représentative de la composition en AG de la matière grasse (résultats non montrés). Il est peu probable que les conditions opératoires utilisées puissent entraîner des dégradations, les résultats obtenus pour la transestérification de l'huile de lin à l'isopropylate étant similaires à ceux obtenus avec le méthylate de sodium (Tableau II).

Remarques sur les méthodes d'estérification

Des considérations sur les mécanismes chimiques pour chacun des cas "acide" et "basique" permettent de comprendre les limites de ces modes d'estérification et leurs différences.

Dans la catalyse acide, le catalyseur est régénéré en fin de réaction (réaction 1) et des EIP et du glycérol sont libérés.

Si les solvants contiennent de l'eau (réaction 2), il y a formation d'AG libres que l'on peut observer en CCM :

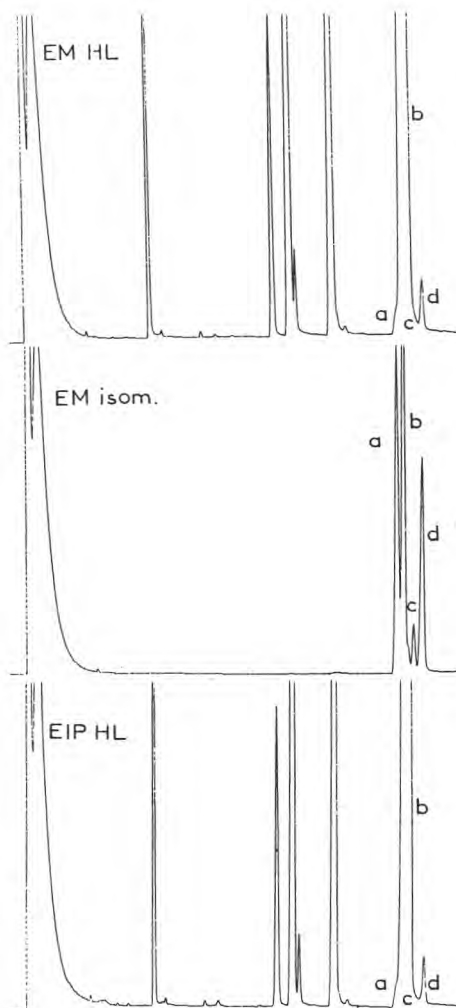
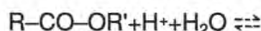
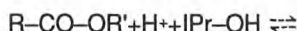
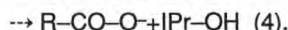
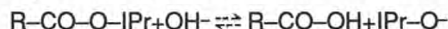
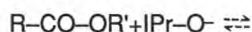


Fig. 2. Comparaison des chromatogrammes obtenus par CPG sur colonne de CP-Wax 52 des EM d'acides gras d'huile de lin obtenus par la méthode au méthylate (EM HL), d'un mélange témoin d'EM d'isomères de l'acide α -linoléique (EM isom.) et des EIP d'acides gras d'huile de lin obtenus par catalyse acide (EIP HL). Températures de la colonne : EM : 195°C; EIP : 197°C. a : 18:3 c,c,t; b : 18:3 c,c,c; c : 18:3 : t,c,t; d : 18:3 t,c,c.



En milieu basique, le réactif est utilisé pour la formation d'EIP (réaction 3); mais si les solvants renferment de l'eau (réaction 4), il y a formation irréversible de sels d'AG :



Les réactions conduisant à la formation d'EIP sont en équilibre. Un excès d'isopropanol dans le cas de la catalyse acide ou d'isopropylate en milieu basique est nécessaire pour entraîner la formation d'un maximum d'EIP. En milieu basique, les AG libres réagissent avec l'isopropylate pour donner des sels de sodium et ne sont pas estérifiés. En revanche, la catalyse acide permet l'estérification des AG totaux, libres ou préalablement estérifiés au glycérol (ou éventuellement engagés dans une liaison amide : cas de la sphingomyéline).

Dans le cas de la catalyse acide, la présence d'eau entraîne la formation réversible d'AG libres. En milieu basique, la formation de sels d'AG est irréversible, ce qui explique qu'il y a plus d'AG libres en milieu basique qu'en catalyse acide. L'utilisation de solvants pratiquement anhydres est donc essentielle si l'on veut minimiser la formation d'AG libres.

Les EIP sont plus sensibles à l'hydrolyse que les TG de départ, et dans l'étape d'attaque de la fonction carbonyle en milieu basique, l'attaque par un alcoolate est plus rapide que l'attaque par l'ion hydroxyle. Il est donc préférable, dans le mode opératoire en milieu basique, de ne

pas trop attendre avant de rajouter HCl 2N, qui neutralise la soude.

Coefficients de réponse des EIP

Considérations théoriques

Les esters d'acides gras analysés par CPG et détectés en ionisation de flamme donnent une réponse qui est proportionnelle non pas à la masse de l'ester, mais à la masse de ses atomes de carbone "actifs". La surface d'un pic correspondant à un ester d'AG doit donc être corrigée par un facteur de réponse théorique F, dont l'expression tient compte du fait que dans un EM d'AG, sont considérés comme également actifs les atomes de carbone autres que celui du groupe carbonyle, qui ne répond pas (Ackman et Sipos, 1964a). F est donc le rapport du poids de l'ester sur la masse des atomes de carbone actifs. Pour un ester constitué d'un AG contenant n atomes de carbone et m doubles liaisons, et d'un alcool contenant n' atomes de carbone :

$$F = (14(n+n') + 32 - 2m) / (12(n+n'-1)).$$

On peut définir un facteur de conversion théorique F' qui permet de corriger les surfaces non plus pour calculer le pourcentage en poids des esters d'AG, mais le pourcentage en poids des AG eux-mêmes. Son expression est :

$$F' = (14n + 32 - 2m) / (12(n+n'-1)).$$

D'après les travaux d'Ackman et Sipos (1964b), l'expression de F (et donc celle de F') ne serait valable que pour les EM d'AG de 9 atomes de carbone et plus. Toutefois, Bannon *et al.* (1982) ont montré expérimentalement que les valeurs de F (et donc celles de F') calculées comme indiqué sont applicables à partir de l'EM de l'acide caproïque, et plus récemment (Bannon *et al.*, 1984), à partir de l'EM de l'acide butyrique. Si l'on prend comme base unitaire, pour les esters d'un même alcool, la valeur du F' à appliquer à la sur-

face du pic de l'ester de l'acide stéarique, le F' relatif à appliquer à la surface du pic d'un ester d'AG quelconque se calcule en divisant son F' par celui correspondant à l'ester de l'acide stéarique. Nous avons calculé, dans le Tableau III, les F' relatifs à appliquer aux surfaces des pics d'esters de méthanol ou d'isopropanol et d'AG contenant de 4 à 20 atomes de carbone, sans tenir compte de la scission en alcool et AG qui peut se produire pour les termes les plus courts dans le détecteur (Ackman et Sipos, 1964b). On peut constater que ce sont les EIP qui nécessitent les F' relatifs les moins variables : de 1,033 à 0,999 pour, respectivement, des AG à 4 et 20 atomes de carbone. Dans le cas des EM, les valeurs correspondantes sont de 1,394 et de 0,989. En l'absence de correction, l'erreur commise pour l'EIP

Tableau III. Facteurs de conversion relatifs théoriques permettant de corriger les surfaces des pics d'esters détectés en ionisation de flamme pour établir les pourcentages en poids d'acides gras, calculés pour des acides gras estérifiés par des alcools contenant 1 ou 3 atomes de carbone (pour le mode de calcul, voir le texte).

Acide gras	Alcool	
	C1	C3
4:0	1,394	1,033
6:0	1,225	1,021
8:0	1,141	1,014
10:0	1,090	1,009
12:0	1,056	1,006
14:0	1,032	1,004
14:1	1,023	0,995
16:0	1,014	1,002
16:1	1,006	0,994
18:0	1	1
20:0	0,989	0,999
18:1	0,993	0,993
18:2	0,986	0,986

de l'acide butyrique n'est que de 3% environ, alors qu'elle est de plus de 40% s'il s'agit de l'EM de cet AG. L'analyse des EIP d'AG par CPG permettrait par conséquent d'éviter d'introduire des corrections pour obtenir les pourcentages réels en poids d'AG à partir des pourcentages des aires des pics des esters, à condition toutefois que tous les autres paramètres analytiques soient optimisés (Craske et Bannon, 1987).

Résultats expérimentaux

Nous avons comparé les pourcentages des surfaces obtenues par analyse en CPG d'un mélange pondéré d'EM avec ceux d'EIP préparés à partir de ces EM par catalyse acide (Tableau IV). Les EM sont injectés immédiatement après mise

en solution dans l'hexane, sans aucun traitement. Ces compositions sont comparées, dans chaque cas, aux pourcentages en poids d'AG calculés après application des facteurs F' relatifs (Tableau III) aux surfaces des pics d'EM ou d'EIP, puis normalisation à 100%. Il ressort de cette comparaison que c'est dans le cas des EIP que la similitude entre pourcentages des surfaces et pourcentages en poids d'AG est la plus grande, et qu'il n'est pratiquement pas nécessaire de corriger les surfaces pour obtenir directement les pourcentages en poids d'AG. En revanche, les pourcentages des surfaces d'EM diffèrent des pourcentages en poids d'AG de façon plus sensible, surtout pour les chaînes les plus courtes. Mais dans les 2 cas, qu'il s'agisse des EM ou des EIP, après application des facteurs de conver-

Tableau IV. Comparaison des pourcentages des surfaces d'EM d'une solution standard, des pourcentages des surfaces des EIP préparés par catalyse acide à partir de ces EM et des pourcentages en poids d'acides gras calculés après application des facteurs du Tableau III aux surfaces et normalisation à 100%.

Acides gras	EM		EIP	
	% de la surface totale ($n=5$) ^a	% des AG totaux	% de la surface totale ($n=5$)	% des AG totaux
4:0	2,10 ± 0,02 ^b	2,86 ^c	2,78 ± 0,02	2,87
6:0	1,61 ± 0,01	1,93	1,93 ± 0,04	1,97
8:0	0,95 ± 0,02	1,06	1,05 ± 0,03	1,06
10:0	3,05 ± 0,03	3,24	3,20 ± 0,10	3,23
12:0	4,20 ± 0,05	4,34	4,25 ± 0,09	4,28
14:0	10,57 ± 0,09	10,66	10,43 ± 0,14	10,47
14:1	2,03 ± 0,01	2,03	2,04 ± 0,05	2,03
16:0	26,09 ± 0,03	25,86	25,75 ± 0,11	25,79
16:1	5,13 ± 0,02	5,04	4,99 ± 0,02	4,96
18:0	10,13 ± 0,08	9,90	10,16 ± 0,20	10,16
18:1	25,68 ± 0,07	24,92	25,02 ± 0,18	24,84
18:2	2,96 ± 0,02	2,85	2,92 ± 0,03	2,88
18:3	3,58 ± 0,02	3,42	5,47 ± 0,10	5,39
20:0	1,94 ± 0,03	1,88		

^a : nombre d'analyses; ^b : moyenne et écart type; ^c : valeurs calculées à partir des moyennes expérimentales.

sion relatifs aux surfaces des pics puis normalisation à 100%, les pourcentages en poids d'AG sont similaires.

Applications

Les pâtes à tartiner à teneur réduite en matières grasses, encore appelées matières grasses allégées, corps gras allégés, pâtes allégées, beurres allégés ou spécialités laitières à tartiner, sont des produits alimentaires relativement nouveaux dont la part du marché est en développement rapide (Anonyme, 1987; Lejeune, 1988). Ces appellations variées recouvrent des produits contenant généralement 41% en poids de matières grasses qui peuvent être des matières grasses laitières ou des huiles végétales uniquement, ou bien des mélanges des deux. Les huiles végétales peuvent être en l'état ou partiellement hydrogénées. Dans le cas des pâtes à tartiner d'origine mixte, sont présents à la fois des acides gras courts et des acides gras polyinsaturés. Il s'agit donc d'une catégorie d'aliments à laquelle les méthodes proposées ici semblent bien adaptées. Dans le Tableau V sont rassemblées les compositions en AG, exprimées en pourcentage des surfaces d'EIP, de la matière grasse de 2 pâtes à tartiner commerciales. Dans ce tableau sont également comparés les pourcentages des surfaces d'EIP obtenus par catalyse acide et en milieu basique à partir de la matière grasse des 2 échantillons. Il se confirme, à l'examen de ce tableau, que la méthode d'estérification des AG n'influe que très peu, ou pas du tout, sur les compositions en EIP. Cela tend à indiquer que les acides gras libres, s'ils sont présents, le sont à des concentrations très basses. On pourra noter le taux élevé d'acide linoléique, qui représente environ un quart de l'ensemble des AG des pâtes à tartiner; dans le beurre, il y en a 10 à 15 fois moins. Dans le cas de l'échantillon B, l'acide α -linoléique (4%)

provient de l'huile de soja utilisée pour sa fabrication et mentionnée sur l'étiquetage. Cet acide est normalement présent dans le beurre, mais à des taux plus bas (entre 0,6 et 1%). D'après la proportion d'acide butyrique présente dans la matière grasse de l'échantillon A, et en se basant sur un taux moyen de 3,6% d'acide butyrique dans la matière grasse du beurre (Jensen *et al.*, 1962; Phillips et Sanders, 1968), on peut estimer que la matière grasse de cet échantillon contient 60% de matière grasse d'"équivalent-beurre". Cette teneur se confirme si l'on compare les proportions d'acides 6:0, 8:0, 10:0, 12:0 et 14:0 avec celles données par Jensen *et al.* (1962). Dans le cas de l'échantillon B, une valeur moyenne de 59% peut être calculée à partir des teneurs en acides 4:0 à 14:0.

Toutefois, un point important que nous n'avons pas abordé reste à étudier. En effet, si les matières grasses d'origine laitière contiennent naturellement un faible pourcentage d'acides gras insaturés de configuration *trans*, il n'en est pas toujours de même des huiles partiellement hydrogénées, et l'utilisation de ces dernières dans les pâtes à tartiner peut accroître le taux d'acides gras *trans*.

Conclusion

Bien que le méthanol soit utilisé dans la très grande majorité des cas pour la préparation des esters d'acides gras de matière grasse d'origine laitière, d'autres alcools ont été proposés en substitution : éthanol (Dickes et Nicholas, 1972), propanol (Grosjean et Fouassin, 1968), butanol (Iverson et Sheppard, 1977), isobutanol (Molnar-Perl et Szakacs-Pinter, 1983) et isopentanol (Trautler *et al.*, 1985). En revanche, il ne semble pas que l'isopropanol ait été étudié dans ce cadre.

Or, l'utilisation de l'isopropanol, d'abord comme solvant en association avec

Tableau V. Compositions en AG, exprimées en pourcentage des surfaces des EIP analysés par CPG, de la matière grasse de 2 échantillons de pâtes à tartiner du commerce. Les EIP ont été obtenus soit par catalyse acide, soit en milieu basique.

Acides gras	Echantillon A		Echantillon B	
	Catalyse acide (%) (n=3) ^a	Milieu basique (%) (n=4)	Catalyse acide (%) (n=3)	Milieu basique (%) (n=4)
4:0	2,11 ± 0,04 ^b	2,21 ± 0,05	1,97 ± 0,04	1,99 ± 0,05
6:0	1,24 ± 0,03	1,28 ± 0,03	1,17 ± 0,02	1,18 ± 0,08
8:0	0,75 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,68 ± 0,03
10:0	1,43 ± 0,02	1,46 ± 0,04	1,51 ± 0,03	1,48 ± 0,07
10:1	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,01
12:0	1,80 ± 0,02	1,81 ± 0,05	1,86 ± 0,04	1,80 ± 0,06
12:1 + 13:0 br	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
X ^c	0,07 ± 0,01	tr	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01
13:0	0,04 ± 0,01	tr	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
iso 14:0	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01
14:0	5,48 ± 0,05	5,44 ± 0,18	5,89 ± 0,08	5,68 ± 0,11
iso 15:0	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
14:1 + a-iso 15:0	0,78 ± 0,01	0,77 ± 0,03	0,73 ± 0,01	0,70 ± 0,01
15:0	0,67 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,60 ± 0,03
iso 16:0	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01
16:0	17,32 ± 0,24	17,32 ± 0,35	20,66 ± 0,35	20,27 ± 0,38
16:1 c + t	0,86 ± 0,02	0,88 ± 0,02	0,91 ± 0,03	0,89 ± 0,01
iso 17:0	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01
a-iso 17:0	0,06 ± 0,01	tr	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
17:0	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01
17:1	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01
18:0	14,09 ± 0,02	13,99 ± 0,18	7,97 ± 0,27	7,88 ± 0,12
18:1 c + t	25,19 ± 0,05	25,04 ± 0,46	22,17 ± 0,20	21,94 ± 0,56
18:2 isom.	0,70 ± 0,03	0,80 ± 0,08	0,37 ± 0,04	0,44 ± 0,03
18:2 n-6	24,81 ± 0,37	24,87 ± 0,40	27,10 ± 0,53	27,90 ± 0,36
20:0	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,38 ± 0,02
18:3 n-3	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	4,01 ± 0,08	4,14 ± 0,06
18:2 c,t conj + 20:1	0,47 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,52 ± 0,01

^a : nombre d'analyses. ^b : moyenne et écart type. ^c : X : composés non identifiés; br : branché; c et t : *cis* et *trans*; conj : conjugué; isom. : isomères de positions et/ou géométriques; tr : traces (< 0,04%).

l'hexane pour l'extraction à température ambiante de la matière grasse de produits laitiers, puis comme alcool pour la préparation des esters isopropyliques des acides gras, présente des avantages par rapport aux méthodes existantes.

Les 2 opérations d'extraction et d'estérification se font en continuité, sans évaporation intermédiaire des solvants, préservant ainsi l'intégrité et la totalité des

composés lipidiques et de leurs acides gras. Ceux-ci sont analysés sans perte ni altération supplémentaire.

D'autre part, les facteurs de conversion relatifs théoriques à appliquer aux surfaces des pics d'esters d'isopropanol et d'acides gras détectés en ionisation de flamme sont très voisins de l'unité, quelle que soit la longueur de chaîne de l'acide gras. Aucun autre alcool (à l'exception de

l'alcool propylique) ne permet d'obtenir ce résultat. Les pourcentages des aires des pics obtenus par CPG (dans des conditions d'analyse optimisées) sont alors pratiquement égaux aux pourcentages en poids des acides gras, sans qu'il soit nécessaire de corriger les aires des pics.

Remerciements

Les auteurs remercient Monsieur le Professeur B. Entressangles pour l'intérêt qu'il a pris à la réalisation de ce travail, Madame Wolff-Augard qui a bien voulu assurer gracieusement la dactylographie du manuscrit, ainsi que Messieurs A. Grangirard et J.L. Sebedio (INRA, Dijon) qui ont fourni les isomères géométriques de l'acide α -linoléique.

Références

- Ackman R.G. & Sipos J.C. (1964a) Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41, 377-388
- Ackman R.G. & Sipos J.C. (1964b) Flame ionization detector response for the carbonyl carbon atom in the carboxyl group of fatty acids and esters. *J. Chromatogr.* 16, 298-305
- Anonyme (1987) Les matières grasses allégées sont-elles ou non une chance pour le beurre ? *Rev. Lait. Fr.* 468, 18-23
- Bannon C.D., Craske J.D., Ngo Trong Hai, Harper N.L. & O'Rourke K.L. (1982) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride-methanol. *J. Chromatogr.* 247, 63-69
- Bannon C.D., Craske J.D. & Hilliker A.E. (1984) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 1501-1507
- Christie W.W. (1982) The preparation of derivatives of lipids. In : *Lipid Analysis*, 2nd edition, Pergamon Press, pp. 51-61
- Craske J.D. & Bannon C.D. (1987) Gas liquid chromatography analysis of the fatty acid composition of fats and oils : a total system for high accuracy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 1413-1417
- Dickes G.J. & Nicholas P.V. (1972) A review of applications of GLC to the analysis of milk and dairy products. *J. Assoc. Publ. Anal.* 10, 87-98
- Folch J., Lees M. & Sloane-Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509
- Grosjean M.H. & Fouassin A. (1968) A propos de la détermination du lactose et de la graisse butyrique dans le pain au lait. *Rev. Ferment. Ind. Aliment.* 23, 57-58
- Groupe de Travail du CNERNA (1972) Dosage de la matière grasse du lait. *Rev. Lait. Fr.* 72, 677-687
- Hara A. & Radin N.S. (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90, 420-426
- Iverson J.L. & Sheppard A.J. (1977) Butyl ester preparation for gas-liquid chromatographic determination of fatty acids in butter. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60, 284-288
- Jensen R.G., Gander G.W. & Sampugna J. (1962) Fatty acid composition of the lipids from pooled, raw milk. *J. Dairy Sci.* 45, 329-331
- Kuzdzal-Savoie S. & Lebon F. (1971) Obtention de la matière grasse du lait (liquide ou en poudre). *Tech. Lait.* 690, 9-13
- Lejeune M. (1987) Spécialités laitières à tartiner : confusion... regrettable. *Rev. Lait. Fr.* 470, 33-38
- Molnar-Perl I. & Szakacs-Pinter M. (1983) Gas chromatographic analysis of C₁-C₂₀ carboxylic acids esterified in aqueous solutions as isobutyl esters. *Chromatographia* 17, 493-496
- Morrison W.R. & Smith L.M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl-acetals from lipids with boron trifluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600-608
- Phillips A.R. & Sanders B.J. (1968) The semi-micro determination of butter fat in fat mixtures by gas chromatography. *J. Assoc. Publ. Anal.* 6, 89-95
- Radin N.S. (1981) Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. *Methods Enzymol.* 72, 5-7
- Traitler H., Richli U., Winter H., Kappeler A.M. & Monnard C. (1985) Fats and Fapes- Transesterification of triglycerides with higher alcohols. Quantitation and mass spectrometric evaluation. Riva del Garda, 6th International Symposium on Capillary Chromatography, pp.

568-574

Wolff R.L., Combe N.A. & Entressangles B. (1985) Modification of alkenyl chain profile in plasmalogens of rat heart mitochondria by dietary trielaidin. *Lipids* 20, 367-372

Wolff R.L. & Castera-Rossignol A.F.M. (1987) Mise au point et évaluation d'une méthode d'extraction de la matière grasse de fromage de type Emmental. *Rev. Fr. Corps Gras* 34, 123-132