

LES ACIDES GRAS *TRANS* DU BEURRE

I. — ISOLEMENT ET DOSAGE

par Simone KUZDZAL-SAVOIE et J. RAYMOND

*Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

Une méthode de dosage direct et pondéral des acides gras *trans* du beurre est décrite.

Cette méthode fait successivement appel à la chromatographie sur colonne et sur couche mince, à la spectrophotométrie infrarouge et à la chromatographie en phase gazeuse.

La teneur élevée en acides gras *trans* du beurre fabriqué pendant la période de pâturage est confirmée.

Des observations nouvelles concernant la configuration de quelques acides gras monoènes mineurs sont indiquées.

I. — INTRODUCTION

A. *Rappel des connaissances concernant les acides gras trans du beurre*

Le beurre contient une certaine proportion d'acides gras *trans*. Parmi ceux-ci, l'acide vaccénique (*trans*-octadécène-11-oïque), pondéralement le plus important, est le plus connu.

Dans une revue déjà ancienne, consacrée aux acides mineurs du beurre, SHORLAND et HANSEN (1957), ont rappelé l'essentiel de nos connaissances concernant l'acide vaccénique. Des informations relatives à l'ensemble des acides gras *trans* du beurre peuvent être trouvées dans l'étude récente de HILDITCH et WILLIAMS (1964).

De nombreux auteurs ont mis en évidence la teneur différente en acide vaccénique des beurres d'été et des beurres d'hiver. Les valeurs indiquées varient selon les auteurs : 1,1 à 4,7 p. 100 (GROSSFELD et SIMMER, 1930), 1,8 à 3,9 p. 100 (BROUWER et JONKER-SCHEFFENER, 1946), 0,3 à 3,5 p. 100 (KUZDZAL-SAVOIE, 1964).

A côté de l'acide vaccénique, existent d'autres acides gras *trans* dans le beurre. Quelques-uns d'entre eux sont connus. Parmi les acides gras *trans* monoènes à 18 atomes de carbone, GUPTA et *al.* ont signalé dès 1950, l'existence de l'acide *trans*-octadécène-10-oïque et en 1953, CORNWELL et *al.* ont soupçonné la présence d'autres isomères de position ; en 1958, BACKDERF et BROWN ont décelé l'acide *trans*-octadécène-16-oïque, présent dans le beurre selon ces auteurs à un taux voisin de 1 à 2 p. 100 des acides gras totaux. Cet acide a été ultérieurement isolé et étudié par HANSEN et COOKE (1961).

SMITH et *al.* ont montré dès 1954 qu'une fraction des acides monoènes à 16, 14 et 12 atomes de carbone possédait la configuration *trans*. En 1958, BACKDERF et BROWN ont précisé que la double liaison de l'acide monoène *trans* à 16 atomes de carbone était placée sur le carbone 9 et que cet acide représentait 0,4 p. 100 des acides gras totaux.

SCOTT et *al.* (1959), puis HERB et *al.* (1962) ont confirmé l'existence des acides monoènes *trans* à 12, 14 et 16 atomes de carbone.

Des acides gras *trans* existent également parmi les acides gras polyènes du beurre. SMITH et JACK (1954) ont établi que l'acide diène conjugué, étudié ultérieurement et à diverses reprises par différents auteurs (cf. RIEL, 1963), possède les configurations *cis-trans* et *trans-trans*, la première configuration étant prépondérante.

Parmi les acides diènes non conjugués à 18 atomes de carbone SAMBASIVARAO et BROWN (1962) ont montré l'existence d'acides diènes *cis-trans* et *trans-cis*, isomères de l'acide linoléique et également d'acides *cis-trans* et *trans-cis* diènes à doubles liaisons plus éloignées.

Ainsi l'ensemble des acides gras *trans* du beurre est d'une grande complexité.

Le taux global des acides gras *trans* du beurre a été déterminé par plusieurs auteurs. Ce taux varie, comme le taux d'acide vaccénique, en fonction de la saison. Il est plus élevé pendant la période de pâturage que pendant la période de stabulation. Les taux suivants ont été signalés par les auteurs : 3,5 à 8 p. 100 selon CORNWELL et *al.* (1953), 2 à 9 p. 100 selon KAUFMANN et *al.* (1961) et 7,7 à 14,9 p. 100 selon GALOPPINI et LOPPI (1964).

B. Méthodes d'étude des acides gras *trans*

a) Méthodes de dosage.

Différentes méthodes ont été utilisées pour doser soit l'acide vaccénique, soit les isomères *trans* totaux.

Le sel de plomb de l'acide vaccénique possède la propriété d'être insoluble dans l'alcool acétique, comme les sels de plomb des acides saturés possédant 14 (ou plus) atomes de carbone. La détermination de l'indice d'iode du groupe « acides saturés » permet ainsi un dosage indirect de l'acide vaccénique du beurre (GROSSFELD et SIMMER, 1930 ; GEYER et *al.*, 1947 ; BROUWER et JONKER-SCHEFFENER, 1946).

Une autre méthode de dosage consiste à utiliser la spectrophotométrie infrarouge en vue du dosage des liaisons *trans* (SWERN et *al.*, 1950 ; AMAT, 1953 ; A. O. C. S. *Tentative method*, 1959). Cette méthode, basée sur une absorption caractéristique à 968 cm^{-1} (10,35 μ), permet de déterminer le pourcentage de liaisons *trans* isolées sans cependant distinguer si celles-ci proviennent d'acides monoènes ou d'acides

diènes. L'observation du spectre permet cependant de déceler l'existence de liaisons *trans* conjuguées. En effet SCOTT et *al.* (1959) ont récemment rappelé qu'une bande d'absorption à 988 cm^{-1} et un doublet à 948 et 982 cm^{-1} indiquent la présence de diènes conjugués *trans-trans* et de diènes conjugués *cis-trans*, respectivement.

L'utilisation de la spectrophotométrie infrarouge en vue du dosage des acides gras *trans*, présente un intérêt limité dans le cas du beurre. En effet, d'une part le taux de *trans* étant faible et parfois très faible (quelques p. 100) la précision du dosage n'est pas très bonne et d'autre part, aucune information n'est fournie sur la nature des acides gras *trans*. CORNWELL et *al.* (1953), SMITH et JACK (1954), BACKDERF et BROWN (1958), HERB et *al.* (1962) et ZEEMAN (1964) qui ont utilisé la spectrophotométrie infrarouge à l'étude des acides gras du beurre l'ont appliquée à l'étude de fractions déjà enrichies en certains acides *trans*. Ces fractions étaient obtenues en utilisant diverses techniques de séparation telles que la cristallisation fractionnée à basse température, la formation des complexes avec l'urée, la chromatographie en phase gazeuse avec récupération des fractions séparées.

b) Méthodes d'isolement.

Celles-ci sont basées sur la propriété que possèdent les isomères *trans* de former avec les sels d'argent des complexes plus instables que les isomères *cis*.

Ce principe a été appliqué pour la première fois par NICHOLS (1952) à la séparation quantitative de l'oléate et de l'élaïdate de méthyle au moyen de la méthode de distribution à contre-courant.

DE VRIES (1962, 1963) a réalisé une séparation semblable (acides stéarique, élaïdique et oléique) sur colonne de silicagel imprégné de nitrate d'argent. Simultanément, la chromatographie sur couche mince s'est révélée apte à séparer efficacement les isomères stériques monoènes ou polyènes (MORRIS, 1962 ; DE VRIES et JURRIENS, 1963 ; de JONG et van der WEL, 1964).

c) Méthode mixte d'isolement et de dosage.

La chromatographie en phase gazeuse, utilisée dans les conditions courantes, c'est-à-dire en utilisant des colonnes traditionnelles, ne permet pas d'isoler les isomères géométriques d'un acide gras ou très difficilement ; cependant en utilisant des colonnes capillaires, la séparation des isomères géométriques est nettement plus aisée. LITCHFIELD et *al.* ont récemment (1963) présenté une mise au point sur cette question.

En 1961, PATTON a présenté des analyses d'esters méthyliques des acides gras du beurre sur colonne capillaire dans lesquelles l'acide vaccénique apparaît parfaitement isolé. Il serait donc possible d'utiliser le chromatogramme obtenu en vue du dosage de l'acide vaccénique. Cependant — à notre connaissance — aucune étude systématique de l'acide vaccénique du beurre (établissement des variations saisonnières du taux de cet acide dans le beurre, par exemple) n'a été effectuée en utilisant cette méthode.

La méthode que nous avons utilisée pour étudier les isomères *trans* du beurre, est à peu de chose près la méthode décrite par DE VRIES (1963) ; nous l'avons cependant complétée par l'utilisation conjointe de plusieurs autres techniques.

Nous décrirons en détail le procédé expérimental utilisé.

II. — MÉTHODE D'ÉTUDE UTILISÉE

La méthode d'étude utilisée est une juxtaposition de plusieurs méthodes : les acides gras *trans* sont isolés par chromatographie de partage sur colonne, le fractionnement est suivi par chromatographie sur couche mince, la configuration stéréochimique est vérifiée par spectrophotométrie infrarouge et la composition des acides gras *trans* isolés est déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

L'utilisation de la chromatographie sur couche mince en vue de contrôler l'efficacité de la colonne est indispensable, car selon les proportions relatives d'acides saturés ou insaturés *trans* et *cis* dans le mélange de départ et selon diverses conditions inhérentes à la chromatographie sur colonne elle-même (notamment le débit d'écoulement du solvant) le fractionnement n'est pas absolument reproductible.

La chromatographie sur colonne permet de travailler avec une quantité environ cent fois supérieure en produits de départ à la quantité qui pourrait être utilisée en chromatographie sur couche mince ; elle permet aussi d'obtenir une meilleure résolution, lors de la séparation des acides saturés et des acides insaturés *trans*.

Nous décrivons rapidement les quatre techniques expérimentales utilisées.

A. La chromatographie sur couche mince

1. Préparation des plaques.

La composition du mélange utilisé pour le revêtement de trois chromatoplaques de 20 cm × 20 cm (couche de 0,5 mm d'épaisseur) a été la suivante : silicagel 30 g, nitrate d'argent 10 g, eau distillée 60 ml.

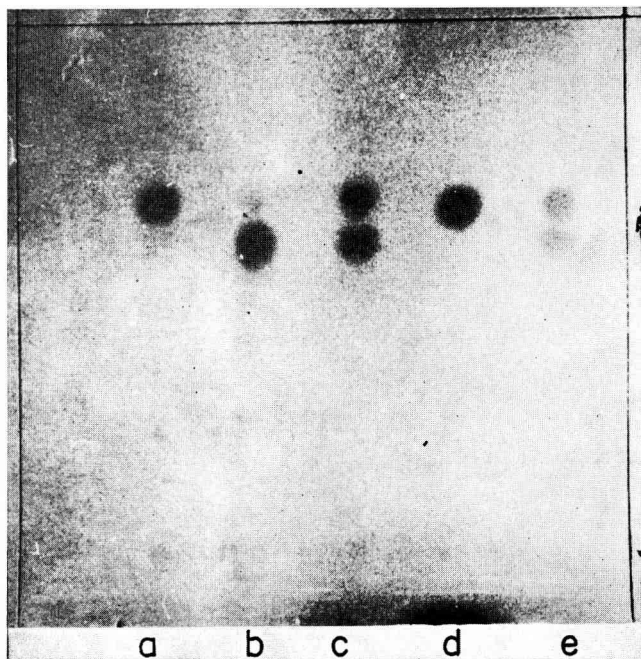


FIG. 1. — Séparation par chromatographie en couche mince, des esters méthyliques des acides gras monoènes-*cis* (oléique) et monoènes-*trans* (élaïdique ou vaccénique)
a, vaccénique ; *b*, oléique ; *c*, oléique + vaccénique ; *d*, élaïdique ; *e*, oléique + élaïdique.
 (L'acide vaccénique contenait une faible fraction d'acide stéarique, non visible sur la figure).
 Conditions de l'analyse : Silicagel imprégné de nitrate d'argent, 30/10 ;
 solvant : benzène/oxyde d'éthyle, 90/10 ; révélateur : vapeurs d'iode.

Les plaques ont été séchées pendant 1 h 30 à la température ambiante puis activées par chauffage 1 h à 110°C, quelques heures avant l'emploi.

2. Dépôt.

Pour chaque dépôt on a utilisé 10 µl de solutions d'esters de référence à 5 p. 100 dans l'oxyde d'éthyle (esters purs ou mélanges) ou 10 µl de solutions d'esters de composition inconnue provenant du fractionnement sur colonne.

La figure 1 donne un exemple de séparation à partir d'esters méthyliques d'acides purs : oléique vaccénique et élaïdique.

3. Développement.

On a utilisé le mélange benzène, oxyde d'éthyle (90 : 10, v/v). La durée du développement a été d'environ une heure.

4. Révélation.

La révélation à l'iode a été généralement utilisée (fig. 1) (la plaque étant placée trente minutes sous une cloche en verre abritant des cristaux d'iode placés dans un petit cristalliseur). Cependant on a souvent utilisé la révélation par pulvérisation d'une solution de dichlorofluorescéine (à 0,2 p. 100 dans l'éthanol) suivie d'une observation sous lumière ultra violette (lampe de Wood). Cette révélation a permis de déceler les taches correspondant aux acides saturés.

L'utilisation successive sur la même plaque des deux systèmes de révélation s'est montrée intéressante : on observe alors en lumière normale des taches jaune-vert ou brunâtres pour les acides insaturés et jaune ocre pour les acides saturés sur fond rosâtre.

B. La chromatographie sur colonne

1. Préparation de la colonne.

On a utilisé une colonne d'acide silicique imprégné de nitrate d'argent, préparée selon la technique décrite par DE VRIES (1963).

L'adsorbant a consisté en 100 g d'acide silicique suspendus dans 200 ml d'une solution aqueuse de nitrate d'argent à 50 p. 100. Le mélange a été chauffé à 100°C pendant trente minutes puis refroidi, filtré sur Buchner et séché à 120°C pendant 16 heures. Il a été ensuite broyé dans un mortier au moment de l'emploi.

La colonne utilisée mesurait 20 cm de hauteur et 14 mm de diamètre. Elle a été remplie avec 10 g d'adsorbant silicique imprégné de nitrate d'argent et 5 g de Céélite 545 (jouant un rôle d'aide-filtrant) mélangés au mortier, et mis en suspension dans 50 ml d'éther de pétrole (p. e. 40-60°C).

Le débit a été d'environ 20 à 22 gouttes par minute.

2. Fractionnement.

La séparation a été effectuée à partir d'environ 100 mg d'esters méthyliques dissous dans l'éther de pétrole (p. e. 40-60°C).

L'éluion a été effectuée à l'aide des solvants suivants : 10 ml d'éther de pétrole (p. e. 40-60°C), 20 ml des mélanges éther de pétrole/benzène à 10 p. 100, 15 p. 100, 20 p. 100, 30 p. 100 et 50 p. 100 de benzène, enfin 40 à 60 ml de benzène pur.

On a recueilli des fractions de 3 ml dans des tubes numérotés, en évitant tout chevauchement de solvant.

Après évaporation presque totale du solvant contenu dans chacun des tubes, une très faible fraction (10 µl) du contenu a été déposé sur les plaques recouvertes de silicagel imprégné de nitrate d'argent.

On a déposé en même temps un mélange témoin composé d'acide stéarique, d'acide vaccénique et d'acide oléique.

3. Développement et révélation.

Les plaques ont été développées dans le solvant benzène-éther éthylique (90/10).

Les tubes ont été réunis en trois groupes correspondant aux acides saturés, insaturés *trans* et insaturés *cis*. Après évaporation totale du solvant et pesée, les fractions obtenues ont été soumises à l'étude par spectrophotométrie infrarouge et par chromatographie en phase gazeuse.

C. Spectrophotométrie infrarouge

On a utilisé un spectrophotomètre Perkin-Elmer 21, à double faisceau, équipé d'un prisme de chlorure de sodium. Les spectres ont été obtenus soit à partir de solutions à 10 p. 100 de matière

grasse de beurre dans le tétrachlorure de carbone, soit à partir des fractions d'esters méthyliques isolées par chromatographie sur colonne et déposées sous forme de films sur les fenêtres de chlorure de sodium.

D. La chromatographie en phase gazeuse

On a utilisé un Aerograph Hy Fi-600 à détecteur à ionisation de flamme. On a successivement analysé les fractions séparées : acides saturés, insaturés *trans* et insaturés *cis*. Une attention particulière a été portée à la composition des esters méthyliques des acides gras isomères *trans*.

III. — APPLICATION AU DOSAGE DES ACIDES GRAS «TRANS» DANS LE BEURRE

Trois échantillons de beurre ont été soumis à l'analyse. On a choisi des échantillons de la même origine (Échiré, Deux-Sèvres) mais fabriqués à des périodes différentes de l'année : mars, avril et mai 1964. Le premier échantillon (N₉) était un beurre d'hiver caractéristique, à indice d'iode bas (29,6) et le troisième (T₁₃) un beurre caractéristique de printemps, c'est-à-dire fabriqué à partir de lait provenant de vaches vivant au pâturage : l'indice d'iode de ce beurre était relativement élevé : 39,0. L'échantillon N₁₁ correspond à un beurre fabriqué pendant une période intermédiaire (indice d'iode : 38,5).

A. Résultats de l'analyse chromatographique sur colonne et sur couche mince

1. Déroulement de l'analyse.

La proportion d'acides *trans* dans le beurre est faible. Cependant l'éluion des esters saturés étant rapide, les esters *trans* apparaissent généralement assez bien isolés. L'éluion des esters insaturés *cis* est par contre plus longue.

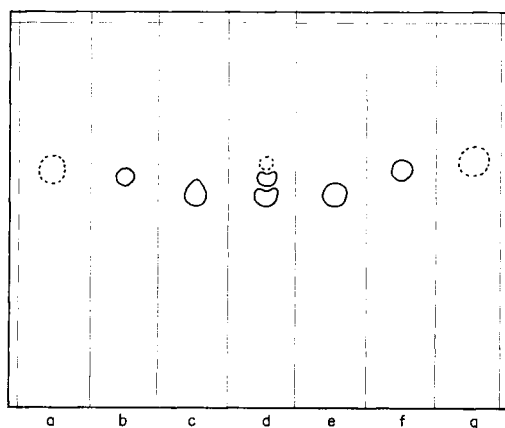


FIG. 2. — Étude par chromatographie en couche mince (silicagel imprégné de nitrate d'argent) des fractions séparées par chromatographie sur colonne, à partir des esters méthyliques du beurre N₉.
Beurre N₉ : a, acides saturés ; b, acides insaturés-*trans* ; c, acides insaturés-*cis*.
Acides témoins : d, mélange des acides oléique, vaccénique et stéarique
e, acide oléique ; f, acide vaccénique ; g, acide stéarique.

La figure 2 montre une chromatographie sur laquelle figurent les esters isolés, à partir du beurre N₉. La tache correspondant aux esters d'acides insaturés *trans* se place nettement au-dessus de la tache correspondant aux esters d'acides insaturés *cis*, et au niveau des esters d'acides vaccénique ou élaidique.

La figure 3 représente l'élu­tion successive des esters méthyliques des acides saturés, insaturés *trans* et insaturés *cis* du beurre N₁₁.

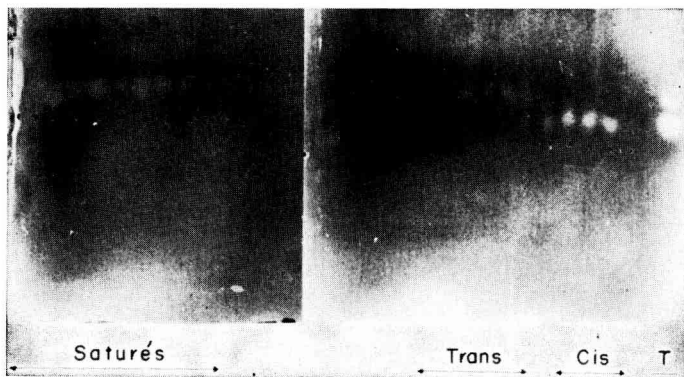


FIG. 3. — Étude par chromatographie en couche mince du fractionnement sur colonne des esters méthyliques des acides gras du beurre

T : témoin (mélange d'esters méthyliques : oléique, vaccénique et stéarique).
Conditions de l'analyse : silicagel imprégné de nitrate d'argent, 30/10 ;
solvant : benzène/oxyde d'éthyle, 90/10 ; révélateur : vapeurs d'iode et dichloroofluorescéine.

2. Résultats pondéraux.

Les résultats des diverses analyses effectuées sur les trois échantillons N₉, N₁₁ et T₁₃ sont présentés dans le tableau 1.

Malgré une récupération incomplète des esters placés sur la colonne — qui s'explique en partie par la perte au cours des opérations analytiques des esters méthyliques d'acides gras à bas poids moléculaire, — la méthode utilisée permet bien l'isolement et le dosage pondéral des acides gras *trans* du beurre. Une différence très nette dans la proportion des acides gras *trans* apparaît entre les échantillons choisis. Cette proportion est faible en hiver (beurre de mars), voisine alors de 2,5 p. 100 des esters totaux, et est beaucoup plus élevée pour l'échantillon de beurre correspondant à la période de pâturage, atteignant 7,5 p. 100 des esters totaux.

B. Résultats de l'analyse par spectrophotométrie

Dans les mêmes conditions de dilution, la bande d'absorption à 10,36 μ est plus forte pour le beurre T₁₃ que pour le beurre N₉, confirmant ainsi la teneur plus grande en acides gras *trans* du beurre T₁₃ que du beurre N₉.

Les spectres infrarouges des fractions d'esters isolés par chromatographie sur colonne ont été examinés ; la portion de ces spectres comprise entre 10 et 11 μ est représentée sur la figure 4. Seule la fraction « acides *trans* » présente une absorption à 10,36 μ .

La spectrophotométrie infrarouge permet de confirmer l'isolement des esters d'acides insaturés *trans* du beurre. La composition des groupes d'esters isolés a été ensuite étudiée par chromatographie en phase gazeuse.

TABLEAU I

Fractionnement des esters méthyliques du beurre sur colonne de gel de silice imprégné de nitrate d'argent

Désignation de l'échantillon	Quantité d'esters déposés		Esters saturés		Esters insaturés <i>trans</i>		Esters insaturés <i>cis</i>		Esters récupérés	
	en pds (mg)	en %	en pds (mg)	en %	en pds (mg)	en %	en pds (mg)	en %	en pds (mg)	en %
<i>Beurre N₉</i> Date de fabrication : 26-3-1964	105,2	100	60,1	57,1	2,5	2,4	31,6	30,0	94,2	89,5
	118,4*	100	60,9	51,4	2,9	2,4	28,0	25,3	91,8	77,6
	108,1	100	60,0	55,4	2,5	2,3	30,0	27,7	92,5	85,4
	108,9	100	63,6	58,4	2,2	2,0	28,5	26,2	94,3	86,6
<i>Beurre N₁₁</i> Date de fabrication : 14-4-1964	100,9	100	61,3	60,7	6,7	6,6	24,5	24,3	92,5	91,8
	106,9	100	60,0	56,1	7,5	7,0	25,0	23,4	92,5	86,5
<i>Beurre T₁₃</i> Date de fabrication : 5-5-1964	104,8	100	48,2	46,0	7,8	7,4	36,5	34,8	92,5	88,3
	115,5	100	52,7	45,6	7,5	6,5	36,7	31,7	96,9	83,9

(*) Moyenne de deux analyses.

C. Résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse permet non seulement de connaître la composition des groupes d'esters isolés mais elle permet aussi de vérifier l'efficacité de la séparation. Cette technique permet ainsi une évaluation des impurétés.

On a porté dans le tableau 2 les proportions relatives des acides majeurs des trois échantillons de beurre. On retrouve les différences bien connues qui distinguent les beurres de printemps des beurres d'hiver : les beurres N₁₁ et T₁₃ contiennent plus d'acide stéarique et d'acide oléique que le beurre N₉. Celui-ci contient davantage d'acide palmitique.

La figure 5 montre la répartition des acides gras du beurre T₁₃ dans les fractions « acides saturés », et « acides insaturés *cis* ». L'analyse par chromatographie

TABLEAU 2

Taux respectifs des acides majeurs dans les beurres N₉, N₁₁, et T₁₃
 (Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques,
 Résultats exprimés en p. 100 des esters méthyliques totaux)

Acides gras	Beurre N ₉	Beurre N ₁₁	Beurre T ₁₃
12:0	4,7	4,9	3,9
14:0	13,2	12,3	11,0
16:0	33,2	27,3	24,9
18:0	6,1	8,0	9,3
18:1	17,3	25,4	26,8

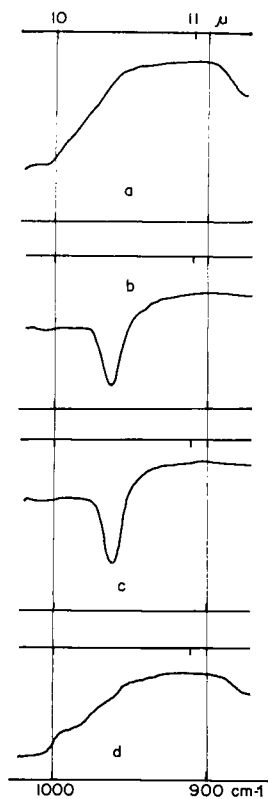


FIG. 4. — Spectres partiels d'absorption dans l'infrarouge, des fractions séparées sur colonne à partir des esters méthyliques totaux du beurre

- a : fraction « acides saturés ».
 b : fraction « acides insaturés *trans* » (N₁₁);
 c : fraction « acides insaturés *trans* » (T₁₃);
 d : fraction « acides insaturés *cis* ».

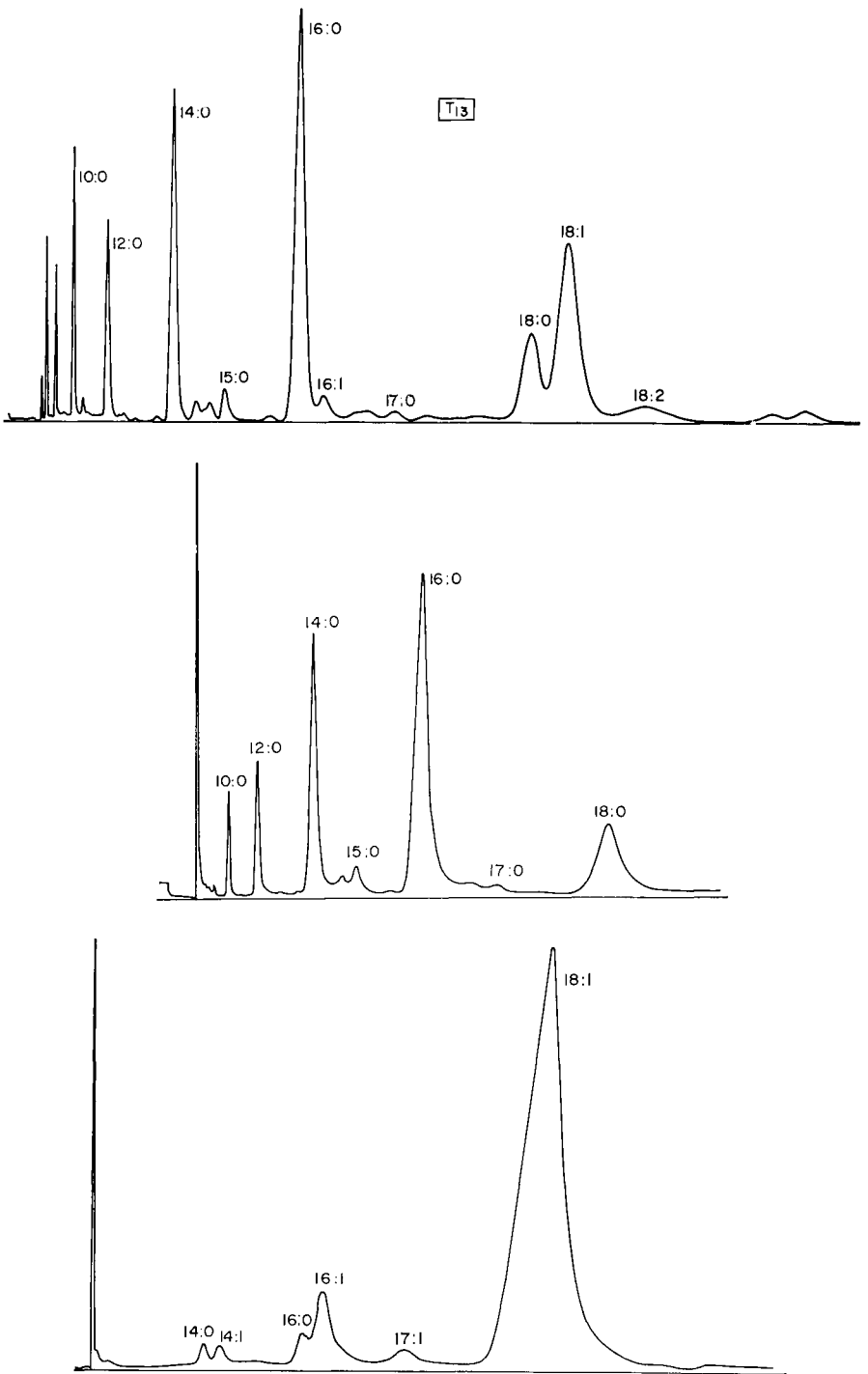


FIG. 5. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras totaux (graphique supérieur), des acides saturés (graphique intermédiaire) et des acides insaturés cis (graphique inférieur), du beurre T₁₃

en phase gazeuse des fractions « acides insaturés *trans* » des beurre T₁₃ et N₁₁ est présentée sur la figure 6.

Dans le groupe des « acides *trans* », l'acide vaccénique est le constituant

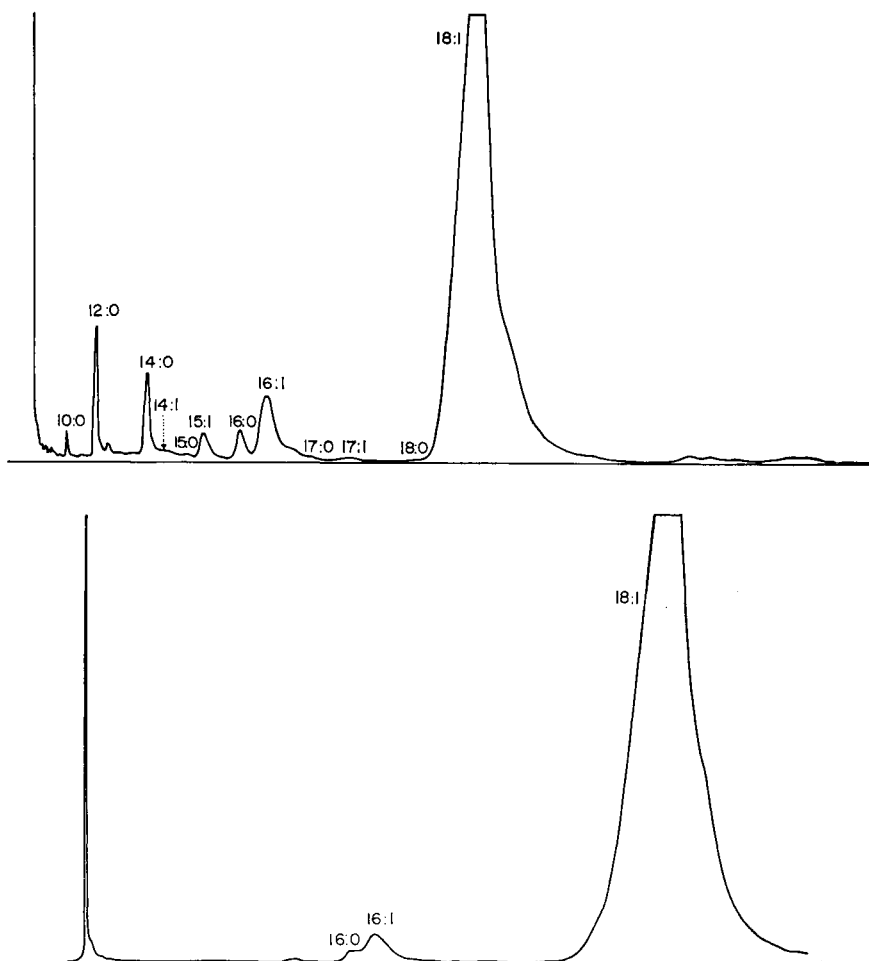


FIG. 6. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras « insaturés *trans* » du beurre T₁₃ (graphique supérieur) et du beurre N₁₁ (graphique inférieur)

Conditions de l'analyse : Aerograph Hy Fi 600. Colonne : 3 m 0,48 (10 pieds) chargée à 15 p. 100 de DEGS sur brique à feu 80 mesh.

majeur. On relève cependant la présence constante de l'ester d'un acide insaturé à 16 atomes de carbone. Compte tenu du fait que le rapport C_{16:1}/C_{16:0} est d'autant plus élevé que la pureté des acides *trans* est plus grande (moins de C_{14:0}, par exemple), on peut affirmer que l'on est en présence de l'acide insaturé *trans* à 16 atomes de carbone. Par ailleurs, la présence également constante de l'acide insaturé à 15 atomes de carbone dans les acides *trans* permet de penser que cet acide possède préférentiellement la configuration *trans*. Par contre, on ne décèle que peu d'acide insaturé à 14 atomes de carbone dans les acides *trans*.

Dans les acides insaturés *cis* on relève à côté de l'acide oléique les acides monoènes à 14 et 16 atomes de carbone ainsi que la présence constante du pic correspondant à l'acide monoène à 17 atomes de carbone. Dans une étude consacrée à cet acide, HANSEN, SHORLAND et COOKE (1960) ont établi la structure *cis* de cet acide. Une fraction mineure de cet acide est cependant souvent observée dans les acides *trans*.

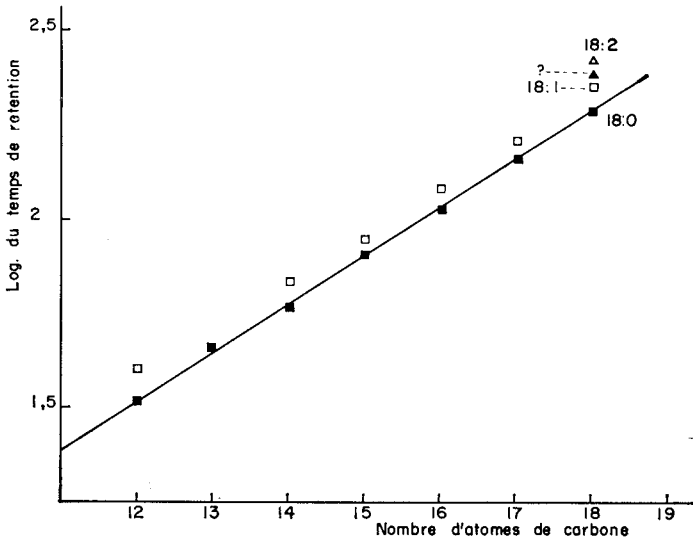


FIG. 7. — Essai d'identification des acides gras de la fraction « Insaturés *trans* » (beurre T_{13})
 ■ Acides saturés □ Acides monoènes ▲ Acide non identifié.

L'observation des chromatogrammes des esters méthyliques des acides saturés et insaturés montre une répartition spécifique des esters selon leur insaturation, mais cette répartition n'est pas idéale puisque des traces d'acides saturés se retrouvent dans les insaturés. Il s'agit principalement d'acides à poids moléculaire moyen ou bas, qui, on le sait, présentent sur colonne ou plaque d'acide silicique une plus grande polarité. Les complexes qu'ils forment avec les sels d'argent peuvent aussi être plus stables que ceux formés par les acides à plus longue chaîne.

Un point a retenu notre attention : on décèle un épaulement sur la partie descendante du pic correspondant à l'acide vaccénique. Le temps de rétention de l'acide qui correspondrait à cet épaulement est intermédiaire entre le temps de rétention de l'acide monoène à 18 atomes de carbone et le temps de rétention de l'acide linoléique, comme le montre un essai d'identification basé sur la mesure du temps de rétention en fonction du nombre d'atomes de carbone et du degré d'insaturation des acides (fig. 7).

IV. — DISCUSSION

A la différence des méthodes jusqu'à maintenant utilisées en vue de déterminer le taux des acides gras *trans* dans le beurre, la méthode décrite et utilisée dans ce travail permet un dosage direct et pondéral des acides gras *trans*.

Les taux d'acides *trans* totaux que nous trouvons dans le beurre, s'alignent sur les taux signalés antérieurement par divers auteurs (BACKDERF et BROWN, 1953 ; KAUFMANN et *al.*, 1962). Par contre, les taux signalés récemment par les auteurs italiens (GALOPPINI et LOTTI, 1964) apparaissent comparativement très élevés.

Le taux des acides gras *trans* dans le beurre semble lié aux conditions d'alimentation des vaches laitières. Certaines indications permettent de penser que la quantité d'acide linoléique présent dans la ration constitue le facteur essentiel (cf. KUZDZAL-SAVOIE, 1964).

La présence des acides *trans* dans le lait de vache est encore imparfaitement expliquée. S'il apparaît probable que cette présence est en rapport avec l'existence au niveau du rumen d'un phénomène d'hydrogénation dont les bactéries sont responsables, et qui porte sur les acides polyinsaturés de la ration (SHORLAND et *al.*, 1957), l'origine même de l'acide vaccénique et des autres acides gras *trans* est encore mal définie.

On a cherché à interpréter l'épaulement observé sur la partie descendante du pic de l'acide vaccénique, lors de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des insaturés *trans*.

Si le comportement de l'acide diène conjugué sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent (DE VRIES et JURRIENS, 1963 ; de JONG et van der WEL, 1964) permet de penser que cet acide a pu se trouver incorporé aux *trans* monoènes, son comportement en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de succinate d'éthylène glycol suffit à infirmer qu'il puisse correspondre à l'épaulement observé. Le temps de rétention de l'acide diène conjugué est en effet nettement plus élevé que le temps de rétention de l'acide linoléique (MAGIDMAN et *al.*, 1963 ; LITCHFIELD et *al.*, 1962). Parmi les acides diènes non conjugués, seul l'acide diène *trans-trans*, qui, à la fois sur couche mince de gel de silice imprégné de nitrate d'argent et sur colonne (capillaire) de succinate de diéthylène glycol précède l'acide linoléique (LITCHFIELD et *al.*, 1962) pourrait être retenu. Cependant, SAMBASIVARAO et BROWN (1962), dans l'étude consacrée aux acides gras polyènes du beurre n'ont pas décelé cet acide dans le beurre. Il semble donc nécessaire de rechercher une autre interprétation. Il existe une quantité notable dans le beurre (1 à 2 p. 100 des acides totaux selon BACKDERF et BROWN (1958) et 0,2 p. 100 selon HANSEN et COOKE (1961)), d'un acide *trans* monoène à 18 atomes de carbone dont la double liaison est située sur le carbone 16. Le temps de rétention de cet acide a été trouvé par HANSEN et COOKE (1961) légèrement supérieur au temps de rétention de l'acide élaïdique, sur colonne d'adipate de polydiéthylène glycol, et récemment HANSEN (1963) a confirmé le comportement caractéristique de cet acide.

Cependant les conditions de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse utilisées par HANSEN et COOKE (1961) et HANSEN (1963) sont légèrement différentes de celles que nous avons nous-mêmes utilisées. Seule une étude de structure des acides *trans* isolés permettrait de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle l'épaulement observé serait dû à l'acide *trans*-octadécène-16-oïque.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Comité de Nutrition de la Délégation générale à la Recherche scientifique à qui nous adressons nos remerciements.

D'autre part, nous remercions également M. MOCQUOT, directeur de la Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux et M. PAQUOT, directeur du laboratoire de Lipochimie (Centre national de la Recherche scientifique) pour les conseils qu'ils ont bien voulu nous donner au cours de ce travail.

SUMMARY

THE « TRANS » FATTY ACIDS OF BUTTER. I. ISOLATION AND ESTIMATION

In the introduction knowledge of the *trans* fatty acids for butter is reviewed. Most is known about vaccenic acid (*trans* octadecen-11-oic) which by weight is the most important. Other monoene *trans* acids also have been reported (*trans* octadecen-10-oic, *trans* octadecen-16-oic, *trans* hexadecen-9-oic) as well as polyene *trans* acids.

The vaccenic acid content and the content of total *trans* fatty acids varies with the season, and the maximum and minimum values established previously are recalled.

After a critical study of the methods used up to the present for estimation of the *trans* fatty acids of butter a new method is described in detail for the isolation and quantitative estimation by weight of the acids. This method successively employs column chromatography and thin-layer chromatography (silica gel impregnated with silver nitrate), infra-red spectrophotometry and chromatography in a gaseous phase.

By this method *trans* fatty acids were estimated in a limited number (3) samples of butter made before, during and after cows had been changed from winter feeding to pasture. The *trans* fatty acids were 2.2 per cent of total fatty acids of butter made in March, when the cows were in stalls, and 7.0 per cent in May when they were on pasture.

The study of the *trans* acids by gas chromatography seemed to show that the *trans* configuration predominated for the monoene acid with 15 carbon atoms, while that configuration was only about 15 per cent of the monoene acid with 16 carbon atoms and the proportions were even less for the acids with 14 and 17 carbon atoms.

The behaviour of the *trans* octadecen-16-oic acid during gas chromatography is discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMAT G., 1953. Mise au point d'une nouvelle technique de dosage de l'acide élaïdique. *Arch. Sci. Phys.*, **7**, 311.
- A.O.C.S. Tentative method : Isolated *trans* isomers. 1959. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **36**, 629.
- BACKDERF H. R., BROWN J. B., 1958. Further contributions to the nature of the monoethenoic fatty acids of butterfat. *Arch. Bioch. Biophys.*, **76**, 15.
- BROUWER E., JONKER-SCHEFFENER M.C.E., 1946. Vaccenic acid in butterfat and the fluctuations in its amount. *Rec. Trav. Chim., Pays-Bas*, **65**, 408.
- CORNWELL D., BACKDERF R., WILSON G., BROWN J., 1953. The *trans*-octadecenoic content of butterfat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 364.
- DE VRIES B., 1962. Quantitative separations of lipid materials by column chromatography on silica impregnated with silver nitrate. *Chem. Ind.*, 1049.
- DE VRIES B., 1963. Quantitative separations of higher fatty acid methyl esters by adsorption chromatography on silica impregnated with silver nitrate. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 184.
- DE VRIES, JURRIENS G., 1963. Trennung von lipiden mittels Dünnschicht. Chromatographie auf mit silbernitrat imprägnierten Kieselgel. *Fette Seifen Anstrich.*, **65**, 725.
- GALOPPINI C., LOTTI G., 1964. Contenuto in isomeri *trans* dei burri italiani del commercio. *Chimica ed Industria*, **46**, 795.

- GEYER R. P., NARTH N., BERKE V. H., ELVEHJEM C. A., HART E. B., 1947. The vaccenic acid content of various fats and oils. *J. Biol. Chem.*, **169**, 227.
- GROSSFELD J., SIMMER A., 1930. *Z. Untersuch. Nahr. Genussm.*, **59**, 239; cités par BROUWER E., JONKER SCHEFFENER M. G. E., 1946.
- GUPTA S. S., HILDITCH T. P., PAUL S., SHRIVASTAVA R. K., 1950. The constitution of vaccenic acid. *J. Chem. Soc.*, London, 3485.
- HANSEN R. P., 1963. Occurrence of *trans*-octadec-16-enoic acid in sheep and ox perinephric fats. *Nature* (London), **198**, 995.
- HANSEN R. P., COOKE N. J., 1961. The isolation and characterization of *trans*-octadec-16-enoic acid from butterfat. *Biochem. J.*, **81**, 237.
- HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1960. The isolation of *cis*-9-heptadecenoic acid from butterfat. *Biochem. J.*, **77**, 64.
- HERB S. F., MAGIDMAN P., LUDDY F. R., RIEMENSCHNEIDER R. W., 1962. Fatty acids of cow's milk. B. Composition by gas-liquid chromatography aided by other methods of fractionation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 142.
- HILDITCH T. P., WILLIAMS P. N., 1964. The chemical constitution of natural fats. 4th ed. Chapman et Hall, Londres.
- de JONG K., van der WEL H., 1964. Identification of some *iso*-linoleic acids occurring in butterfat. *Nature* (London), **202**, 553.
- KAUFMANN H. B., VOLBERT F., MANKEL G., 1961. Anwendung der IR. Spektrographie auf dem Fettgebiet. V. Untersuchung von Milchfetten auf *trans*-ungesättigte Fettsäuren. *Fette Seifen Anstr.*, **63**, 251.
- KUZDZAL-SAVOIE S., 1964. Influence de la composition de la ration sur la composition chimique du beurre de vache. Thèse (série A, n° 4277-5128), Faculté des Sciences, Paris.
- LITCHFIELD C., ISBELL A. F., REISER R., 1962. Analysis of the geometric isomers of methyl linoleate by gas-chromatography. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 330.
- LITCHFIELD C., REISER R., ISBELL A. F., 1963. The analysis of *cis-trans* fatty acid isomers using gas-liquid chromatography. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 302.
- MAGIDMAN P., HERB S. F., BARFORD R. A., RIEMENSCHNEIDER R. W., 1962. Fatty acids of cow's milk. A. Techniques employed in supplementing gas-liquid chromatography for identification of fatty acids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 137.
- MORRIS L. J., 1962. Separation of higher fatty acid isomers and vinylogues by thin-layer chromatography. *Chem. Ind.*, 1238.
- NICHOLS E. L., 1952. Coordination of silver ion with methyl esters of oleic and elaidic acids. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 1091.
- PATTON S., 1960. Gas-chromatography analysis of milk fat. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1350.
- RIEL R. R., 1963. Physicochemical characteristics of Canadian milk fat. Unsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.*, **46**, 102.
- SAMBASIVARAO K., BROWN J. B., 1962. The nature of the C₁₈ polyethenoic fatty acids of butterfat. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **30**, 340.
- SCOTT W. E., MAGIDMAN P., RIEMENSCHNEIDER R. W., 1959. Unsaturated fatty acids of butterfat. *J. Agric. Food. Chem.*, **7**, 125.
- SHORLAND F. B., HANSEN R. P., 1957. The minor fatty acid constituents of butterfat. A review. *Dairy Sci. Abstr.*, **19**, 168.
- SHORLAND F. B., WEENINK R. O., JOHNS A. T., McDONALD I. R. C., 1957. The effect of sheep rumen contents on unsaturated fatty acids. *Biochem. J.*, **67**, 328.
- SMITH L. M., JACK E., 1954. The unsaturated fatty acids of milk fat. II. Conjugated and non conjugated constituents. *J. Dairy Sci.*, **37**, 390.
- SMITH L. M., JACK E., 1954. The unsaturated fatty acids of milk fat. III. Geometrical isomerism. *J. Dairy Sci.*, **37**, 399.
- SWERN D., KNIGHT H. B., SHREVE O. D., HEETHER M. R., 1950. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **27**, 17. Cité par AMAT G., 1953.
- ZEEMAN I., POKORNY J., 1964. Bestimmung der Spurenfettsäuren des Milchfettes. *Die Nahrung*, **8**, 70