

## Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier (CPG/IRTF) dans l'analyse des acides gras d'origine biologique

J.-L. Le Quéré et E. Sémon

INRA, Laboratoire de Recherches sur les Arômes, 17 rue Sully, 21034 Dijon Cedex, France

Gas chromatography coupled with Fourier transform infrared spectrometry differentiates fatty acid methyl ester geometric isomers. The spectra of mono- and di-unsaturated compounds exhibited *cis* (Z) and *trans* (E) specific bands. Cyclic fatty acid monomers showed characteristic spectra of the ring structure. The spectra acquired with both the light-pipe and the direct deposition interfaces showed significant differences due to the respective vapour and condensed phases used in the systems.

### Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (CPG-IRTF)

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse structurale qui apporte des informations sur les fonctions

chimiques présentes dans les molécules et permet de différencier les isomères. Utilisée comme méthode d'investigation complémentaire, elle valide ou infirme la nature des composés supposée d'après la seule spectrométrie de masse, qui reste néanmoins la technique de référence d'analyse structurale des produits volatils grâce au couplage à la chromatographie en phase gazeuse.

La spectroscopie infrarouge est la technique de choix pour l'identification des configurations *cis* (Z) et *trans* (E) des substances oléfiniques. C'est pourquoi elle est utilisée depuis longtemps pour l'analyse des acides gras insaturés. Le développement d'interféromètres rapides et sensibles et les nombreux avantages de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier [1] ont permis son extension au couplage avec la chromatographie en phase gazeuse, rendant ainsi possible l'analyse directe de mélanges complexes tels que les arômes et les mélanges d'isomères géométriques d'acides gras, généralement étudiés dérivés sous forme d'esters méthyliques [2].

Il existe actuellement trois principaux types d'interfaces rendant possible le couplage d'un chromatographe en phase gazeuse avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier. La plus courante de ces interfaces est une cellule thermostatée appelée *light-pipe*. Elle permet d'enregistrer des spectres infrarouges en phase vapeur directement en ligne dans l'effluent chromatographique. Les principes généraux du couplage CPG-IRTF par une telle interface [3] ainsi que des applications pour l'analyse de substances volatiles sont décrites dans des articles auxquels le lecteur pourra se reporter [4-6].

Le principal inconvénient d'une telle interface est son manque de sensibilité. La limite d'identification, différente de la limite de détection proprement dite, mais seule véritablement utile lors de l'analyse d'esters méthyliques d'acides gras, est de l'ordre de quelques dizaines de nanogrammes par analyte. De plus, le *light-pipe* est à l'origine d'une dégradation de la résolution chromatographique de par le volume mort qu'il introduit au sein de la chromatographie. Les échantillons d'esters méthyliques d'acides gras se trouvent souvent en mélanges complexes présentant une grande dynamique de concentration (par exemple : des traces d'isomères *trans* dans un mélange complexe majoritairement de configuration *cis*). Dans ces conditions, la détection des composés mineurs n'est pas aisée sans une concentration préliminaire de l'échantillon entraînant la saturation de la colonne chromatographique. Pour pallier cet inconvénient, deux autres interfaces plus sensibles ont été développées. L'une d'entre elles permet de piéger les solutés élués du chromatographe en phase gazeuse dans une matrice d'argon sur un disque rotatif maintenu à la température de l'hélium liquide (11 K). Les spectres des composés ainsi analysés sont des spectres de réflexion en matrice d'argon [7]. Un seuil de détermination de quelques picogrammes comparable à celui atteint en spectrométrie de masse est ainsi couramment obtenu. Un tel couplage a permis d'analyser avec succès de nombreux mélanges d'acides gras [8-10]. Les principales limites de ce type d'interface CPG-IRTF sont les coûts initial et de fonctionnement de cette technologie liés à l'ultra-vide et à l'utilisation de l'hélium liquide mais aussi à la particularité des spectres en matrice d'argon qui sont enregistrés.

Le troisième type d'interface, dénommée à dépôt direct, fonctionne à la température plus accessible de l'azote liquide (77 K). L'effluent chromatographique est directement déposé sur une fenêtre en séléniure de zinc (ZnSe) refroidie par de l'azote liquide et placée dans une enceinte maintenue sous vide. Cette fenêtre, mue par un moteur pas-à-pas, se déplace en continu et les composés y sont condensés sous forme de petites taches de 100 micromètres de diamètre environ puis analysés classiquement par transmittance en léger différé au moyen d'un dispositif de type microscope [11]. Ce système a déjà trouvé un intérêt pour l'analyse d'esters méthyliques d'acides gras [12].

### Quelques applications de la CPG-IRTF à l'analyse de dérivés d'acides gras

La spectroscopie infrarouge présente une grande efficacité pour distinguer les isomères. Ainsi, les spectres des élaidate et oléate de méthyle, respectivement 9E et 9Z

octadéc-9-énoate de méthyle, sont présentés sur les figures 1 et 2. L'analyse de tels spectres permet tout d'abord de confirmer la présence de la fonction ester dans chacune des molécules. La bande située à 1755  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la bande d'élongation de la fonction carbonyle ( $\nu_{\text{C=O}}$ ). Cette fonction ester est confirmée par la bande ( $\nu_{\text{C-O}}$ ) observée autour de 1170  $\text{cm}^{-1}$ . Les isoméries géométriques de ces deux composés sont caractérisées quant à elles grâce à la présence de bandes caractéristiques des insaturations. La bande située à 968  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 1) est attribuée à une déformation hors-du-plan de la liaison CH ( $\delta_{\text{C-H}}$ ) spécifique d'une configuration *trans*. Une bande de même nature qui correspond à une liaison *cis* absorbe très faiblement à une valeur proche de 710  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 2). Il faut néanmoins noter que cette bande est parfois totalement absente de certains spectres. Une isomérie *cis* est alors caractérisée par l'absence de la bande *trans* mais également et surtout par la présence de la bande d'absorption d'élongation de la liaison  $\text{=C-H}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) située à 3013  $\text{cm}^{-1}$ . Il faut remarquer que ces spectres enregistrés en phase vapeur (interface de type *light-pipe*) diffèrent sensiblement de ceux acquis en phase condensée [12]. Un déplacement de plusieurs dizaines d'unités de nombres d'onde vers les grandes valeurs peut être constaté pour les spectres en phase vapeur puisque dans ce cas les interactions avec le milieu sont inexistantes ; en prenant pour exemple la bande carbonyle, on constate que pour un ester méthylique d'acide gras celle-ci absorbe plutôt dans la région 1720 - 1740  $\text{cm}^{-1}$  en phase condensée.

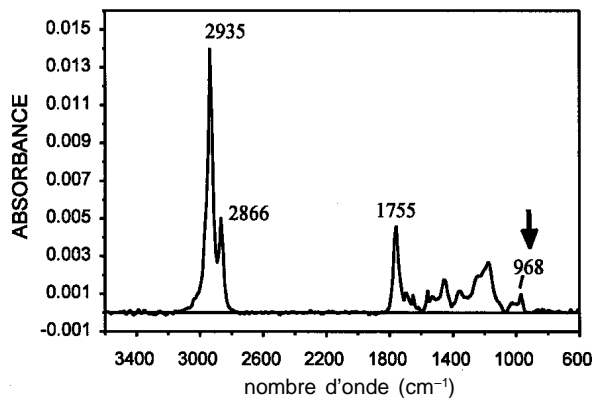


Figure 1. Spectre CPG-IRTF (phase vapeur) de l'élaidate de méthyle.

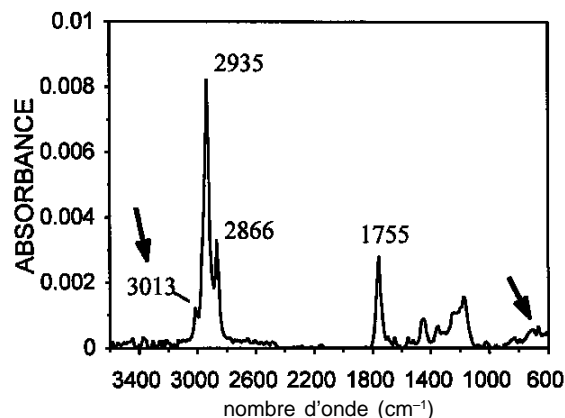


Figure 2. Spectre CPG-IRTF (phase vapeur) de l'oléate de méthyle.

Les acides eicosapentaénoïques (EPA, C20:5) et docosahexaénoïques (DHA, C22:6) sont produits *in vivo* par élongation des acides polyinsaturés en C18, notamment l'acide linoléique, ingérés par l'alimentation [13]. Les traitements technologiques, en particulier thermiques, produisent une isomérisation d'une ou plusieurs doubles liaisons *cis* des acides gras en C18. Cette isomérisation en *trans*, thermodynamiquement favorisée, se retrouve dans les acides gras polyinsaturés C20:5 et C22:6. Les figures 3 et 4 présentent deux exemples de spectres de docosahexaénoates de méthyle. Le premier des deux (Fig. 3) correspond à un composé dont toutes les insaturations sont de configuration *cis*. Une large bande d'absorption de moyenne intensité (mais néanmoins largement visible, comparée à celle mentionnée dans les spectres précédemment étudiés) située à 716 cm<sup>-1</sup> correspond cette fois encore à la déformation hors-du-plan de la liaison CH (d<sub>C-H</sub>) des liaisons *cis*. La bande la plus intense de ce spectre se situe à 3018 cm<sup>-1</sup>, elle est attribuée à une élongation de la liaison =C-H (ν<sub>C-H</sub>) confirmant la configuration *cis* de ces insaturations. La molécule dont le spectre est présenté figure 4 renferme cinq doubles liaisons de configuration *cis* et une sixième de configuration *trans*. Cette dernière est mise en évidence par la présence d'une bande située à 970 cm<sup>-1</sup>.

Les traitements technologiques apportés aux huiles végétales produisent également des composés cycliques dont certains peuvent s'accumuler après ingestion dans les tissus tels que le foie, le cœur ou la rétine et présenter une certaine

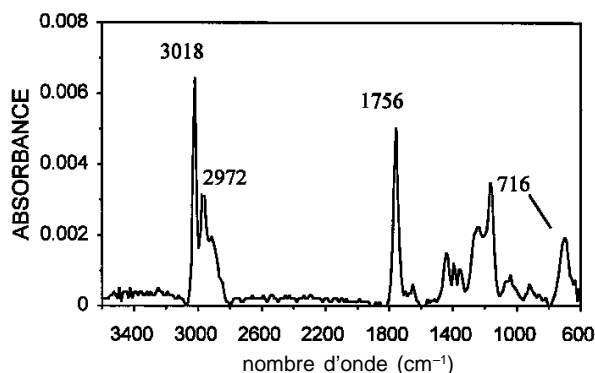


Figure 3. Spectre CPG-IRTF (phase vapeur) de docosahexahénoate de méthyle (6 liaisons *cis*).

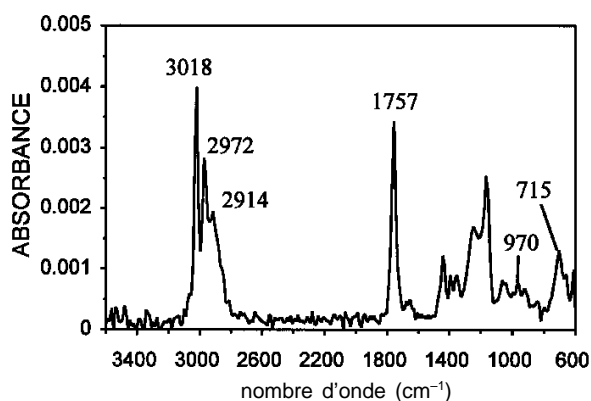


Figure 4. Spectre CPG-IRTF (phase vapeur) de docosahexahénoate de méthyle (5 liaisons *cis*, 1 liaison *trans*).

toxicité [14]. Ces dérivés cycliques fournissent des spectres infrarouges dont les caractéristiques ont notoirement contribué à l'identification de leur structure et de leurs mécanismes de formation à partir des acides gras polyinsaturés en C18 [15]. Les figures 5 et 6 présentent les spectres en phase vapeur ainsi que la structure correspondante de deux esters méthyliques isomères de monomères cycliques d'acides gras isolés dans l'huile de lin chauffée. Ces deux produits renferment chacun deux liaisons éthyléniques, la première sur la chaîne carbonée linéaire et la seconde dans le cycle cyclopentényl et cyclohexényl. Les bandes d'absorption situées à 966 cm<sup>-1</sup> (Fig. 5) et 968 cm<sup>-1</sup> (Fig. 6) correspondent, conformément à la valeur observée sur le spectre de l'élaidate de méthyle, à la bande d'absorption de déformation hors-du-plan d<sub>C-H</sub> de la double liaison de configuration *trans* située sur les chaînes latérales. Ces spectres présentent également deux autres bandes caractéristiques de l'insaturation *cis* intracyclique. Sur la figure 5 les bandes d'intensité moyenne situées à 712 cm<sup>-1</sup> et à 3061 cm<sup>-1</sup> peuvent être attribuées respectivement à une déformation hors-du-plan d<sub>C-H</sub> et à une élongation ν<sub>C-H</sub> de la double liaison du cycle cyclopentényl. Ces bandes d'absorption se déplacent vers des nombres d'onde plus faibles pour le cycle cyclohexényl (Fig. 6) : la bande d<sub>C-H</sub> est observée à 662 cm<sup>-1</sup> et la bande ν<sub>C-H</sub> à 3032 cm<sup>-1</sup> (ces dernières valeurs étant

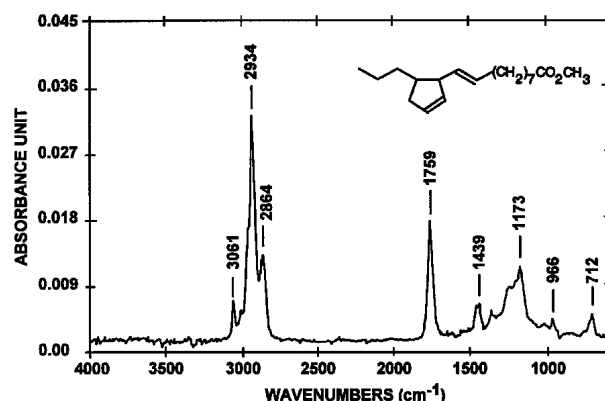


Figure 5. Spectre CPG-IRTF (phase vapeur) de monomère cyclique d'acide gras isolé d'huile de lin chauffée (10-(2-propylcyclopent-4-ényl)-déc-9-énoate de méthyle).

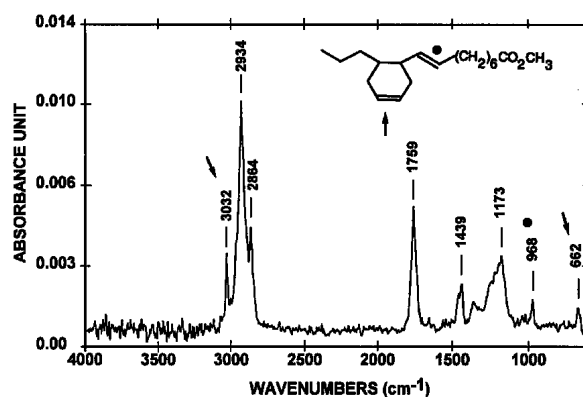


Figure 6. Spectre CPG-IRTF (phase vapeur) de monomère cyclique d'acide gras isolé d'huile de lin chauffée (9-(2'-propylcyclohex-4-éthyl)-non-B-énoate de méthyle).

équivalentes à celles observées dans le spectre du cyclohexène). Des tensions de liaisons plus faibles dans un cycle comptant six atomes de carbone justifient ces déplacements par rapport aux valeurs observées dans le cycle dénombrant cinq atomes de carbone.

Les huiles végétales sont partiellement hydrogénées pour leur donner une certaine plasticité adaptée à leur utilisation ultérieure telle que les margarines. Néanmoins, ce processus est à l'origine d'une isomérisation des acides gras insaturés *cis*. Certains composés *trans* diinsaturés tel que l'acide *trans*-9,*trans*-12-octadécadiénoïque (*t9,t12*-18:2) obtenus après hydrogénation sont à l'origine d'effets physiologiques indésirables. C'est pourquoi une technique analytique a été recherchée pour identifier et quantifier les isomères de telles molécules. L'interface infrarouge à matrice d'argon a été utilisée avec succès pour identifier et quantifier l'ester méthylique de *t9,t12*-18:2 et d'autres isomères dans de l'huile de soja et des margarines [8]. La présence d'une ou deux doubles liaisons *trans* dans les isomères d'esters méthyliques d'acides gras est à l'origine de deux bandes d'élongation  $\nu_{C-H}$  visibles aux valeurs approximatives de 3035 et 3005  $cm^{-1}$ . Les doubles liaisons *cis* sont mises en évidence par une bande à 3010  $cm^{-1}$  si l'insaturation est unique et 3018  $cm^{-1}$  s'il s'agit de deux ou trois doubles liaisons. Les auteurs ont également constaté que l'intensité de ces bandes de liaisons *cis* ou *trans* est directement proportionnelle au nombre d'insaturations. Dans le même temps, l'intensité de la bande d'élongation de liaison aliphatique C-H rapportée à celle de la fonction carbonyle décroît en fonction du nombre croissant d'insaturations. Des travaux ultérieurs complémentaires ont permis d'identifier des isomères diinsaturés du *t9,t12*-18:2 d'après l'attribution des bandes d'absorption présentes dans la zone de déformation hors-du-plan [10]. Les isomères *trans-trans* non conjugués possèdent une bande à 972  $cm^{-1}$  tandis qu'elle se situe à 990  $cm^{-1}$  dans les spectres de composés aux insaturations conjuguées. Les spectres des produits diinsaturés *cis-trans* non conjugués présentent deux bandes à 730  $cm^{-1}$  et 971  $cm^{-1}$  tandis que la conjugaison des insaturations est à l'origine de trois bandes à 731  $cm^{-1}$ , 950  $cm^{-1}$  et 986  $cm^{-1}$ .

Dans le but d'étudier la nature des acides gras polyinsaturés *trans* assimilés par des nourrissons lors de leur allaitement, l'analyse de laits maternels a été réalisée [16]. La spectroscopie infrarouge s'est avérée cruciale pour différencier la géométrie de deux esters d'acides gras diinsaturés C18:2 isomères, conjugués en positions 9 et 11 [12]. Les spectres ont été enregistrés en phase condensée sur une interface à dépôt direct. La bande caractéristique de la conjugaison *trans-trans* du composé dont le spectre est présenté figure 7 se trouve à 990  $cm^{-1}$ . Il s'agit de la bande  $\delta_{CH}$  de déformation hors-du-plan. Il faut remarquer dans ce spectre la grande intensité de cette bande ainsi que son déplacement de 20  $cm^{-1}$  vers les valeurs élevées des nombres d'onde par rapport à celle présente dans le spectre en phase condensée de l'élaidate de méthyle (non présenté). De plus, une bande d'élongation  $\nu_{C-H}$  située à 3016  $cm^{-1}$  confirme cette conjugaison. Le spectre de la figure 8 est celui du composé conjugué *cis-trans*. Les trois bandes de vibration hors-du-plan observées à 726, 950 et 986  $cm^{-1}$  d'intensité moyenne sont caractéristiques de ce type de produits. L'attribution de ces bandes peut se faire de façon identique à celle utilisée pour les spectres collectés en matrice d'argon [10] : la première bande à la configuration *cis* de l'une des deux insaturations,

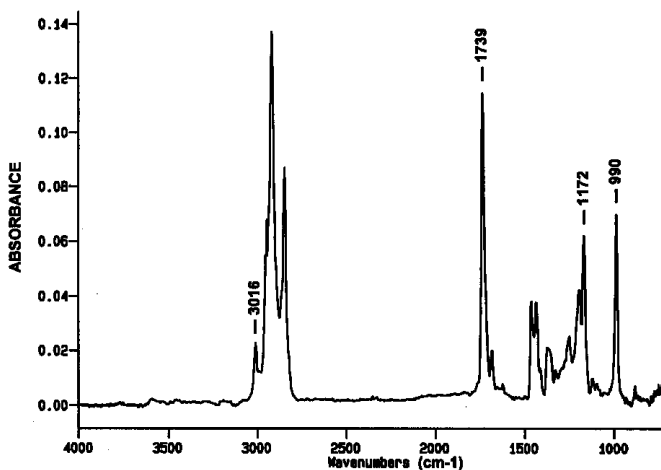


Figure 7. Spectre CPG-IRTF (dépôt direct) de *cis*, *trans* octa-déca-9,11-diénoate de méthyle.

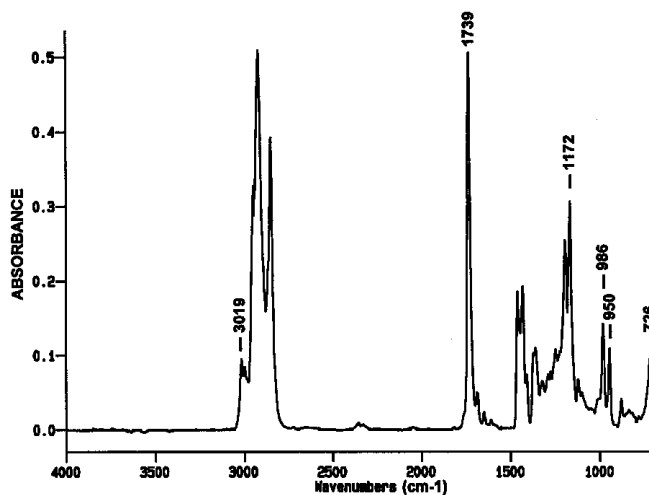


Figure 8. Spectre CPG-IRTF (dépôt direct) de *trans*, *trans* octa-déca-9,11-diénoate de méthyle.

tandis que les deux autres bandes se rapportent à la seconde liaison éthylénique *trans*. Le couple de bandes de la région 3000–3020  $cm^{-1}$  correspond aux bandes d'élongation  $\nu_{C-H}$  de la double liaison *cis* conjuguée.

Le spectre présenté en figure 9 est celui de l'ester méthylique cyclique obtenu en phase condensée à l'aide d'une interface à dépôt direct. Il peut être comparé avec le spectre en phase vapeur de ce même composé (Fig. 6). Ces deux spectres aux aspects globalement similaires montrent cependant plusieurs différences dues à la nature de l'interface IRTF utilisée pour leur acquisition. Un déplacement de certaines bandes vers des valeurs de fréquence plus faibles est constaté pour le spectre de phase condensée, en particulier les bandes d'élongation des liaisons C-H ( $\nu_{C-H}$ ) dans la région 2850–3020  $cm^{-1}$  ainsi que la bande d'élongation de la fonction carbonyle  $\nu_{C=O}$  située à 1739  $cm^{-1}$ . Cette dernière, rapportée à la bande d'élongation de liaison aliphatique C-H est plus intense dans le spectre de phase condensée. Les bandes d'absorption observées y sont également plus fines que dans le spectre de phase vapeur (i.e. le dédoublement

des bandes d'élongation ( $\nu_{C=O}$ ) de la fonction ester à  $1775\text{ cm}^{-1}$ ). La caractérisation structurale de la molécule est cette fois encore possible grâce à la présence de deux bandes caractéristiques situées à  $3020\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C-H}$ ) et  $974\text{ cm}^{-1}$  *trans* ( $\delta_{C-H}$ ). La bande observée à  $662\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre en phase gazeuse et caractéristique de la liaison *cis* intracyclique n'est cependant pas présente dans ce spectre en phase condensée, la bande passante du détecteur utilisé dans ce cas ( $4000 - 700\text{ cm}^{-1}$ ) ne permettant pas sa détection.

Afin de localiser les doubles liaisons des acides gras insaturés, ces composés peuvent être transformés en dérivés 2-alcényl-4,4-diméthylloxazolines (DMOX) avant leur analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse [17]. En effet, ces dérivés fournissent par impact électronique des fragments caractéristiques de la position des liaisons éthyléniques mais néanmoins sans que les isomérisations *cis-trans* puissent être différenciées pour autant. L'analyse par CPG-IRTF reste donc indispensable pour identifier parfaitement ces dérivés. L'étude des spectres infrarouges en phase vapeur des composés DMOX dérivés des acides élaidique et oléique révèle des bandes informatives de la structure des produits analysés [18]. Les bandes caractéristiques du cycle oxazoline sont celles trouvées à  $1670\text{ cm}^{-1}$  et  $998\text{ cm}^{-1}$  correspondant respectivement aux bandes d'élongation  $\nu_{C=N}$  et  $\nu_{C-O}$ . Comme ces bandes n'interfèrent pas avec les bandes de déformation hors-du-plan des liaisons *cis* ou *trans* (identiques à celles observées pour les esters méthyliques), il est également possible dans ce cas d'établir la configuration des insaturations de chacune des molécules.

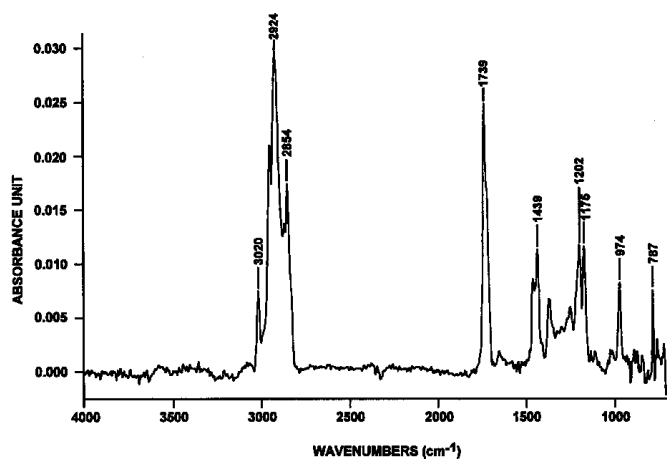


Figure 9. Spectre CPG-IRTF (phase condensée) de monomère cyclique d'acide gras isolé d'huile de lin chauffée (9-(2-propylcyclohex-4-ényl)-non-8-énoate de méthyle).

## Conclusion

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier permet une détection avec une bonne sensibilité des composés élués d'un chromatographe en phase gazeuse. Elle résout de manière positive et le plus souvent de façon complémentaire à la spectrométrie de masse leur identification grâce à l'analyse des informations spectrales caractéristiques qu'elle fournit. Dans le cas particulier de dérivés d'acides gras, elle met en évidence sans ambiguïté les isoméries géométriques des doubles liaisons. L'interprétation complète de spectres collectés à l'aide des nouvelles interfaces CPG-IRTF quelles qu'elles soient nécessite pourtant une certaine prudence par le manque de références existant dans ce domaine dans les différentes banques de données.

## Références

- Griffiths, P. R.; de Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Elving, P. J.; Winefordner, J. D. Eds., John Wiley and Sons, New York, 1986.
- Le Quéré, J. L. in: *new trends in lipids and lipoprotein analyses*, Perkins, E. G.; Sébédio, J. L. Eds., AOCS Press, Champaign IL, 1995; pp 232-241.
- Herres, W. HRGC-FTIR: *Capillary Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Theory and Applications*, Chromatographic Methods, Bertsch, W.; Jennings, W. G.; Kaiser, R. E. Eds., Hüthig, Heidelberg, 1987.
- Le Quéré, J. L.; Sémon, E.; Latrasse, A.; Etiévant, P.; *Sci. Alim.* **1987**, 7, 93-109.
- Le Quéré, J. L. *Analisis* **1992**, 20(7), M46-M49.
- Le Quéré, J. L.; Sémon, E. *Analisis* **1996**, 24(4), M20-M22.
- Reedy, G. T.; Ettinger, D. G.; Schneider, J. F.; Bourne, S. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1602-1609.
- Mossoba, M. M.; McDonald, R. E.; Chen J.-Y. T.; Armstrong D. J.; Page, S. W. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 86-92.
- Mossoba, M. M.; McDonald, R. E.; Armstrong, D. J.; Page, S. W. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 695-699.
- Mossoba, M. M.; McDonald, R. E.; Armstrong, D. J.; Page, S. W. *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, 29, 324-330.
- Bourne, S.; Haefner, A. M.; Norton, K. L.; Griffiths, P. R. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2448-2452.
- Sémon, E.; Ferary, S.; Auger, J.; Le Quéré, J. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, 75(2), sous presse.
- Grandgirard, A.; Piconneaux, A.; Sébédio, J. L.; O'Keefe, S. F.; Sémon, E.; Le Quéré, J. L. *Lipids* **1989**, 24(9), 799-804.
- Sébédio, J. L.; Chardigny, J. M. in: *Deep Frying: Chemistry, Nutrition, and Practical Applications*, Perkins, E. G.; Erickson, M. D. Eds., AOCS Press, Champaign IL, 1996; pp 183-209.
- Sébédio, J. L.; Le Quéré, J. L.; Sémon, E.; Morin, O.; Prévost, J.; Grandgirard, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1987**, 64(9), 1324-1333.
- Chardigny, J. M.; Wolff, R. L.; Mager, E.; Sébédio, J. L.; Martine, L.; Juanéda, P. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1995**, 49, 523-531.
- Yu, Q. T.; Liu, B. N.; Zhang, J. Y.; Huang, Z. H. *Lipids* **1989**, 24, 79-83.
- Wahl, H. G.; Habel, S. Y.; Schmieler, N.; Liebich, H. M. *J. High Resol. Chromatogr.* **1994**, 17, 543-548.