

L'analyse des acides gras en électrophorèse capillaire

N. Mofaddel et A. Desbène-Monvernay

Laboratoire d'Analyse des Systèmes Organiques Complexes, IRCOF-UPRES EA 2659 et IFRMP, 43 rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France

The analysis of fatty acids by Capillary Electrophoresis has been expanding over the last ten years. From the first approaches performed by CZE with acids presenting short normal chains, studies become more diversified thanks to the potentialities offered by Capillary Electrophoresis (use of micelles of various nature, study in non aqueous media). So, analyses of complex mixtures of fatty acids from C₁₀ to C₂₄, with normal and substituted chains have been successfully performed.

Introduction

Les acides monocarboxyliques aliphatiques, communément appelés acides gras, dérivent d'huiles ou de graisses végé-

tales ou animales, ou bien encore s'y trouvent sous forme d'esters. Les acides gras naturels ont une chaîne de 4 à 28 atomes de carbone, en général non ramifiée et à nombre pair d'atomes de carbone. Cette chaîne carbonée peut être saturée ou insaturée. Les acides gras sont nécessaires à l'organisme humain et par suite leur analyse s'avère fondamentale tant sur le plan du contrôle en recherche médicale que pour évaluer la pureté, l'origine ou la fraîcheur des aliments dits « frais ». Du fait de leur présence dans des matrices complexes et de l'absence de groupement chromophore en leur sein (groupement chromophore permettant leur détection aisée dans la gamme classique de l'UV), les quelques méthodes de séparation utilisées jusque dans les années 80 ont pour la plupart nécessité une transformation de ces acides. Ainsi en chromatographie liquide haute performance (HPLC) ont-ils souvent été estérifiés, avant ou après la séparation, afin de leur conférer soit une forte absorbance, soit une fluorescence [1-6]. À l'heure actuelle, leur analyse est encore pour l'essentiel, réalisée par chromatographie en

phase gazeuse (GC) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID). Pour ce faire, ces acides doivent être dérivés avant analyse. Le but de cette dérivation étant d'augmenter leur volatilité, c'est aux esters méthyliques ou silyliques que l'on a recours [7-10].

Seul un petit nombre de techniques a permis l'analyse directe de ces acides gras. Ces méthodes ont été proposées non seulement en chromatographie en phase gazeuse, grâce à l'utilisation de colonnes spécialement conçues pour ces applications [11,12], mais également en chromatographie en phase supercritique (SFC) [13] ou bien encore en chromatographie liquide en association avec une détection UV à basse longueur d'onde [14]. L'isotachophorèse a été également largement utilisée [15,16].

Face à ce constat, l'électrophorèse capillaire est très vite apparue comme une alternative intéressante puisqu'elle apporte, en plus de son haut pouvoir de résolution et de son faible coût de mise en œuvre, un large champ d'applications compte-tenu des diverses conditions opératoires qui lui sont associées.

Différentes approches

Les premiers travaux ont été effectués essentiellement sur les acides gras à courtes chaînes ($< C_8$) car ces derniers peuvent être fortement chargés dans des solutions aqueuses de pH approprié et donc possèdent une grande mobilité électrophorétique d'où des temps d'analyse réduits. X. Huang et al., en 1989, ont été parmi les premiers à utiliser l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) pour l'analyse d'acides carboxyliques de faibles masses moléculaires ($C_1 - C_7$) contenus dans des échantillons de vins blanc ou rouge [17]. Le tableau I regroupe les différentes conditions expérimentales utilisées en fonction des caractéristiques de la chaîne grasse.

Par la suite M.T. Ackermans et al. ont utilisé la CZE, parallèlement à l'équipe de J. Romano [18], afin de comparer les caractéristiques de la détection en UV indirecte et de la détection conductimétrique, lors de l'étude d'un mélange d'acides gras saturés ($C_1 - C_6$). Dans cette étude, ils présentent également un traitement théorique de la réponse en détection UV indirecte [19].

L'analyse d'acides présentant de plus longues chaînes carbonées n'a été mise en œuvre que très récemment en faisant appel soit à la chromatographie capillaire électrocinétique micellaire (MEKC), soit à la CZE. En effet, le problème majeur de ces études est en fait la difficulté croissante à solubiliser totalement les échantillons, dès que la longueur de la chaîne augmente ($> C_7$). L'ajout de cosolvant organique dans les électrolytes de séparation résout partiellement cette difficulté.

Ainsi, F.B. Erim et al. [20] utilisent la MEKC, avec une détection UV indirecte, afin de séparer un mélange de 13 acides gras de C_8 à C_{20} . L'emploi du dodécylbenzènesulfonate de sodium (SDBS), tensioactif anionique, comme chromophore dans un électrolyte constitué de 50 %

d'acétonitrile et de polyoxyéthylène-23-lauryl éther (Brij 35) conduit à une bonne séparation du mélange en moins de 20 minutes. Dans cette étude, il est montré l'influence de la longueur de la chaîne carbonée sur l'hydrophobicité des acides, cette dernière augmentant avec le nombre d'atomes de carbone. En réalité, lors de cette analyse le SDBS ne joue que le rôle de chromophore, la forte teneur en acétonitrile ne permettant pas la réalisation des micelles de SDBS. Enfin à titre d'exemple, ces auteurs appliquent leur système électrophorétique à l'analyse d'échantillons de beurre.

Dans le même esprit, R. Roldan-Assad et P. Gareil développent parallèlement une autre stratégie basée sur la CZE, le mode de détection étant également la détection UV indirecte. Ainsi, grâce à l'utilisation concomitante de triméthyl- β -cyclodextrine et de méthanol, ils parviennent à séparer en moins de 16 minutes un mélange d'acides gras saturés allant de C_8 à C_{18} et atteignent des seuils de détection de l'ordre de $1,2 \times 10^{-5}$ M. Fort de ce résultat, leur système est appliqué à un extrait d'huile de coco [21].

Dans la même période, G. Gutnikov et al. développent un système électrophorétique contenant 60 % d'acétonitrile et de l'acide trinitrobenzènesulfonique afin d'étudier les acides gras dans des hydrolysats [22]. Appliquant également la CZE, A. Desbène et al. utilisent un électrolyte contenant 40 % d'éthanol en association avec une détection fluorimétrique indirecte induite par laser (LIF). Ils obtiennent ainsi des limites de détection d'environ 700 à 800 ppb [23].

Plus récemment, J. Collet et P. Gareil, continuant l'étude initiée par R. Roldan-Assad, appliquent aux acides gras saturés et insaturés ($C_{14} - C_{18}$) la technique précédemment utilisée en changeant légèrement la composition de l'électrolyte de séparation, la triméthyl- β -cyclodextrine étant substituée par la diméthyl- β -cyclodextrine. Ils parviennent à des seuils limites de détection de l'ordre de 10^{-6} M et l'appliquent alors à la détermination de la composition d'huiles végétales (soja, tournesol et olive) [24].

Par la suite W. Buchberger et K. Winna montrent que la CZE est une méthode parfaitement adaptée à la séparation d'une matrice complexe contenant des acides gras saturés ou insaturés ($C_4 - C_{24}$). Ils réalisent une séparation en moins de 9 minutes, atteignant des seuils de détection d'environ 5 $\mu\text{g/mL}$ (cf. Fig. 1). Ils donnent à titre d'exemple l'électrophorégramme obtenu sur un échantillon de beurre [25].

Dans la même période, une étude, initiée par B.L. De Backer et L.J. Nagels, couple la CZE à une détection potentiométrique. Ces auteurs analysent les acides carboxyliques présentant une longueur de chaîne inférieure ou égale à 10 ; grâce à leur système, ils obtiennent des seuils de détection correspondant à des concentrations de l'ordre de 10^{-6} M et étudient les facteurs influençant la détection potentiométrique, tels que la nature de l'électrolyte, la tension de séparation ou la nature et la taille des électrodes [26].

Dernièrement en 1997, O. Schmitz et S. Gäßl appliquent la MEKC, couplée à un détecteur à barrettes de diodes (UV-DAD), à l'analyse d'un mélange contenant des isomères d'hydroperoxydes d'acides gras insaturés (acides oléique,

Tableau I. Conditions opératoires pour l'analyse des acides gras par Électrophorèse Capillaire, en fonction des caractéristiques de leur chaîne carbonée. a) Entre parenthèses est rapportée la longueur effective (longueur séparant la cellule de détection de l'extrémité où est effectuée l'injection). b) MES : acide 2-morpholinoéthanesulfonique, c) HIS : histidine, d) TTAB : bromure de triméthyltétradécylammonium, e) Tris : tris (hydroxyméthyl) méthylamine, f) SDBS : dodécylbenzènesulfonate de sodium, g) Z1-méthyl : sulfonate de triméthylammoniumpropane, h) HEPES : acide *N*-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-*N'*-2-éthanesulfonique.

Auteurs	Echantillon	Capillaire ^a	T (°C)	λ (nm)	(kV)	Electrolyte	Détection	Réfs.
X. Huang et al.	C ₁ – C ₇ saturés	Silice vierge 42 cm (40) × 75 μm	–	–	20	MES ^b /His ^c TTAB ^d (pH = 5,9)	10 mM 0,5 mM	conductimétrique [17]
M.T. Ackermans et al.	C ₁ – C ₆ saturés	Silice vierge 57 cm (50) × 75 μm	25	254	25	Acide benzoïque Tris ^e (pH = 8,5)	10 mM	UV indirect [19]
F.B. Erim et al.	C ₈ – C ₂₀ saturés	Silice vierge 60 cm (45) × 50 μm	23	198	20	SDBS ^f Brij 35 (pH = 8,5) Acétonitrile	10 mM 30 mM 50 %	UV indirect [20]
R. Roldan-Assad et al.	C ₇ – C ₁₈ saturés	Silice vierge 40 cm (22) × 50 μm	30	270	30	Tris p-anisate Triméthyl-β-CD (pH = 8,2) Méthanol	20 mM 10 mM 1 mM 60 %	UV indirect [21]
A. Desbène et al.	C ₇ – C ₁₈ saturés	Silice vierge 57 cm (50) × 50 μm	40	–	30	Borax Fluorescéine (pH = 9,2) Ethanol	5 mM 10 ⁻³ mM 40 %	LIF [23]
J. Collet et al.	C ₁₄ – C ₁₈ saturés et insaturés	Silice vierge 72 cm (50) × 50 μm	27	260	30	Tris p-anisate Diméthyl-β-CD (pH = 8,1) Méthanol	10 mM 5 mM 1 mM 50 %	UV indirect [24]
W. Buchberger et al.	C ₄ – C ₂₄ saturés et insaturés	Silice vierge 40 cm (20) × 75 μm	45	240	30	diéthylbarbiturate Z1-Méthyl ^g (pH = 10,5) Éthylèneglycolmono- méthyléther	5 mM 0,5 mM 70 %	UV indirect [25]
B.L. De Backer et al.	C ₁ – C ₁₀ saturés	Silice vierge 60 cm × 75 μm	25	–	20	HEPES ^h (pH = 7)	5 mM	potentiométrique [26]
O. Schmitz et al.	C ₁₈ insaturés peroxydés	Silice greffée C ₁₈ 57 cm (50) × 50 μm	25	195	28	phosphate de K Brij 35 (pH = 6,30) Ethanol	60 mM 1,1 g L ⁻¹ 30 %	UV-DAD [27]
O. Schmitz et al.	C ₂₀ insaturés peroxydés	Silice vierge 47 cm (40) × 50 μm	25	–	28	phosphate de K Brij 35 SDS (pH = 6,30) Ethanol	60 mM 0,8 g L ⁻¹ 35 mM 30 %	UV-DAD [28]
E. Drange et al.	C ₁₄ – C ₂₆ saturés	Silice greffée PTFE 67 cm (46) × 75 μm	25	264	20	Tris Acide anthraquin- one-2-carboxylique (pH = 10,4) NMF-Dioxane	40 mM 2,5 mM (3:1, v/v)	UV indirect [30]
J. Collet et al.	C ₁₄ – C ₂₀ saturés et insaturés	Silice vierge 35 cm (27,5) × 50 μm	25	254	30	Tris p-anisate Brij 35 (pH = 8,1) Méthanol	10 mM 5 mM 10 mM 50 %	UV indirect [31]
K. Heinig et al.	C ₁₂ – C ₂₄ saturés et insaturés	Silice vierge 57 cm (50) × 50 μm	25	214	20	p-hydroxybenzoate Tris Brij 35 (pH = 6) Acétonitrile	10 mM 5 mM 40 mM 50 %	UV indirect [32]

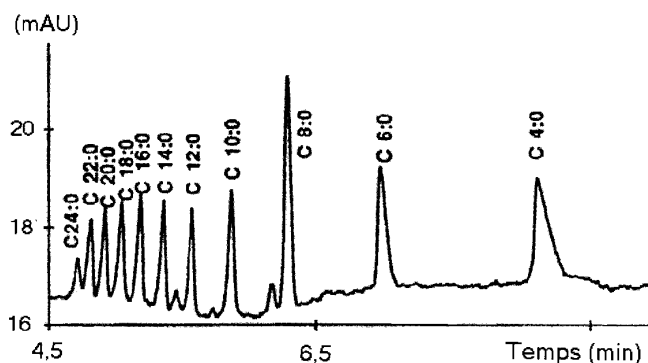


Figure 1. Electrophorogramme d'un mélange standard d'acides gras saturés [25]. *Conditions opératoires* : Capillaire en silice fondue, 30 cm \times 75 μ m I.D. ; Électrolyte de séparation : 5 mM diéthylbarbiturate (pH = 10,5) contenant 0,5 M Z1-Méthyl et 70 % Éthylène glycol monométhyléther ; Tension appliquée : 30 kV ; Température : 45 °C ; Détection UV indirecte à 240 nm ; Injection hydrodynamique : 3 s. (Reproduit avec l'accord de W. Buchberger.)

linoléique et linoléique (C_{18}). Ces composés, résultant de la réaction entre les acides gras correspondants et l'oxygène ont été récemment mis en cause dans l'athérosclérose ; ils sont également responsables, lors de leurs dégradations, de l'odeur rance caractéristique des produits périmés. L'équipe de O. Schmitz compare l'utilisation d'un capillaire vierge en silice fondue avec celle d'un capillaire greffé C_{18} . Elle remarque ainsi que la reproductibilité est meilleure sur le capillaire greffé mais pas la résolution ni les limites de détection ($1,9 \times 10^{-4}$ M contre 9×10^{-5} M avec un capillaire de silice vierge) [27]. Poursuivant leur étude, ces auteurs analysent des isomères hydroperoxydés de l'acide arachidonique (C_{20}) par l'intermédiaire de micelles mixtes de Brij 35 et de dodécylsulfate de sodium (SDS) [28]. Afin d'abaisser leurs limites de détection, ils ont tout dernièrement couplé leur système électrophorétique précédemment optimisé à un détecteur LIF. Ce couplage nécessite une post-dérivation de leurs composés afin de leur conférer un fluorophore. Ils obtiennent ainsi des seuils de détection divisés par dix (de l'ordre de $1,5 \times 10^{-5}$ M) [29].

Parallèlement à ces études, E. Drange et E. Lundanes, se basant sur la très faible solubilité des acides gras à longues chaînes en solution aqueuse, présentent des travaux sur des acides gras saturés à longues chaînes carbonées (C_{14} à C_{26}) par électrophorèse capillaire en milieu non aqueux. Ils optimisent leur séparation grâce à un système électrophorétique à base de *N*-méthylformamide (NMF). Ils obtiennent ainsi en moins de 16 minutes, la séparation d'un mélange de 9 composés avec des limites de détection de l'ordre de $2,5 \times 10^{-5}$ M (cf. Fig. 2). Face à ce constat très positif, ce système est alors appliqué avec succès à l'analyse d'une huile de poisson [30].

Reprenant leurs précédents travaux [24] et ceux de F.B. Erim [20], J. Collet et P. Gareil font une étude d'un mélange contenant des acides gras saturés et insaturés pré-

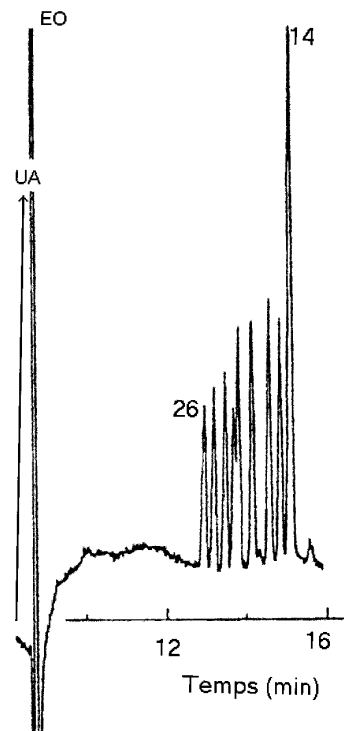


Figure 2. Séparation d'un mélange d'acides gras de C_{14} – C_{26} [30]. *Conditions opératoires* : Capillaire greffé, 67 cm (46 cm jusqu'au détecteur) \times 75 μ m I.D. ; Electrolyte de séparation : 4,0 mM Tris, 0,25 mM acide anthraquinone-2-carboxylique (pH = 10,4) dans un mélange NMF - Dioxane (3 : 1, v/v) ; Tension appliquée : 20 kV ; Température : 25 °C ; Détection indirecte à 264 nm ; Injection hydrodynamique : 6 s. (Reproduit avec l'accord de E. Lundanes.)

sentant des longueurs de chaîne variant de C_{14} à C_{20} , en utilisant la MEKC. Ils développent alors un traitement théorique, basant leurs travaux sur le modèle physico-chimique développé par S. Terabe et al., afin de modéliser l'influence de l'ajout de cosolvant organique (méthanol) dans l'électrolyte de séparation ainsi que celle de la concentration en tensioactif (Brij 35). Ils parviennent ainsi à séparer leur mélange test en moins de 5 minutes (cf. Fig. 3) [31]. Enfin ces travaux ont été très récemment repris par K. Heinig et al. dans le but d'opérer une étude comparative entre l'électrophorèse capillaire et l'HPLC [32].

Cette revue rapide des divers travaux effectués en électrophorèse capillaire sur les acides gras ne se prétend pas exhaustive. En effet, cette technique analytique est encore en plein essor dans ce domaine comme dans tant d'autres comme le montrent les travaux de R. Szücs et al. sur l'analyse des phospholipides dans les lécithines par MEKC [33] ou ceux de M. Arellano et al. sur l'analyse simple et rapide en CZE d'acides gras en vue de caractériser des bactéries anaérobies [34] ou bien encore l'étude de A.V. Nawaby et al. sur l'huile de castor réalisée grâce à l'utilisation de l'HP- β -cyclodextrine dans un électrolyte à base de Tris (pH = 8) [35].

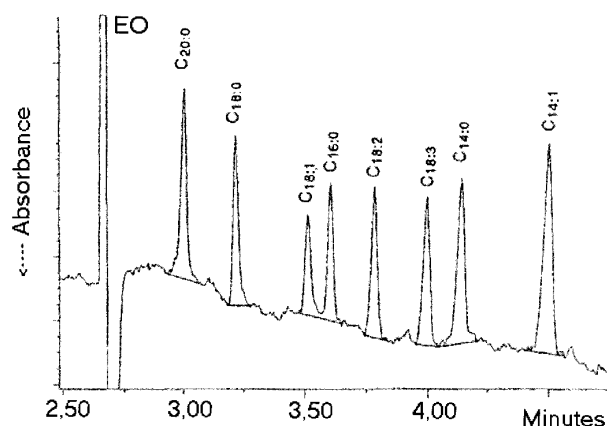


Figure 3. Séparation d'un mélange test d'acides gras linéaires saturés et insaturés [31]. Conditions opératoires : Capillaire en silice fondue, 35 cm (27,5 cm jusqu'au détecteur) \times 50 μ m I.D. ; Electrolyte de séparation : 10 mM Tris - 5 mM p-anisate (pH = 8,1) contenant 10 mM Brij 35 dans un mélange méthanol-eau (50 : 50, v/v) ; Tension appliquée : 30 kV ($I = 4 \mu$ A) ; Température : 25 °C ; Détection UV indirecte à 254 nm ; Injection hydrodynamique : 5 s. (Reproduit avec l'accord de P. Gareil).

Conclusion

L'électrophorèse capillaire apparaît donc comme une technique parfaitement adaptée à l'analyse des acides gras et des corps gras. Les résolutions obtenues, la rapidité des séparations, les faibles consommations de solvant et d'échantillon constituent les points forts de cette méthode.

À l'heure actuelle, il est donc possible de séparer des matrices complexes contenant des acides, saturés ou insaturés, présentant des chaînes plus ou moins longues ($C_8 - C_{24}$) linéaires ou ramifiées. Néanmoins, une des faiblesses de cette technique réside dans les limites de détection encore trop élevées (de l'ordre de 10^{-5} M) imposées par la détection UV indirecte. Les couplages électrophorèse capillaire - LIF [36], électrophorèse capillaire - spectrométrie de masse [37] sont actuellement en plein développement afin de rendre cette technique analytique encore en émergence compétitive également sur le plan de la sensibilité.

Références

- Cooper, M.; Anders, M. W. *J. Chromatogr. Sci.* **1975**, *13*, 407-415.
- Gübitz, G. *J. Chromatogr.* **1980**, *187*, 208-211.
- Tsuchiya, H.; Hayashi, T.; Naruse, H.; Takagi, N. *J. Chromatogr.* **1982**, *234*, 121-130.
- Schwarzenbach, R. *J. Chromatogr.* **1982**, *251*, 339-347.
- Lawrence, J. F.; Frei, R. W. *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*; Elsevier, Amsterdam, 1976; p 127.
- Engelhardt, H.; Elgass, H. *J. Chromatogr.* **1978**, *158*, 249-259.
- Baty, J. D.; Willis, R. G.; Tavendale, R. *J. Chromatogr.* **1986**, *353*, 319-328.
- Shanta, N. C.; Napolitano, G. E. *J. Chromatogr.* **1992**, *624*, 37-51.
- Eder, K.; Reichlmayr-Lais, A. M.; Kirchgessner, M. *J. Chromatogr.* **1992**, *598*, 33-42.
- Ballesteros, E.; Cardenas, S.; Gallego, M.; Valcarcel, M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 628-634.
- Sakodinsky, K. I.; Smolyaniniv, G. A.; Zelvensky, V. Y.; Glotova, N. A. *J. Chromatogr.* **1979**, *172*, 93-105.
- De Jong, C.; Badings, H. T. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 94-98.
- Tsuyama, Y.; Uchida, T.; Goto, T. *J. Chromatogr.* **1992**, *596*, 181-184.
- Batta, A. K.; Dayal, V.; Colman, R. W.; Sinha, A. K.; Sheffer, S.; Salen, G. *J. Chromatogr.* **1984**, *284*, 257-260.
- Koval, M.; Kaniansky, D.; Hutta, M.; Lacko, R. *J. Chromatogr.* **1985**, *325*, 151-160.
- Barth, T. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2232-2237.
- Huang, X.; Luckey, J. A.; Gordon, M. J.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 766-770.
- Romano, J.; Jandik, P.; Jones, W.; Jackson, P. *J. Chromatogr.* **1991**, *546*, 411-421.
- Ackermans, M. T.; Everaerts, F. M.; Beckers, J. L. *J. Chromatogr.* **1991**, *549*, 345-355.
- Erim, F. B.; Xu, X.; Kraak, J. C. *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 471-479.
- Roldan-Assad, R.; Gareil, P. *J. Chromatogr. A* **1995**, *708*, 339-350.
- Gutnikov, G.; Beck, W.; Engelhardt, H. *J. Microcol. Sep.* **1994**, *6*, 565-570.
- Desbène, A.; Morin, C. J.; Mofaddel, N. L.; Groult, R. S. *J. Chromatogr. A* **1995**, *716*, 279-290.
- Collet, J.; Gareil, P. *J. Cap. Elec.* **1996**, *3*, 77-81.
- Buchberger, W.; Winna, K. *Mikrochim. Acta* **1996**, *122*, 45-52.
- De Backer, B. L.; Nagels, L. *J. Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4441-4445.
- Schmitz, O.; Gäb, S. *J. Chromatogr. A* **1997**, *767*, 249-253.
- Schmitz, O.; Gäb, S. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 215-221.
- Schmitz, O.; Melchior, D.; Schuhmann, W.; Gäb, S. *J. Chromatogr. A* **1998**, *814*, 261-265.
- Drange, E.; Lundanes, E. *J. Chromatogr. A* **1997**, *771*, 301-309.
- Collet, J.; Gareil, P. *J. Chromatogr. A* **1997**, *792*, 165-177.
- Heinig, K.; Hissner, F.; Martin, S.; Vogt, C. *Amer. Lab.* **1998**, *30*, 24-29.
- Szücs, R.; Verleysen, K.; Duchateau, G. S.; Sandra, P.; Vandeginste, B. G. M. *J. Chromatogr. A* **1996**, *738*, 25-29.
- Arellano, M.; Elkaddouri, S.; Roques, C.; Couderc, F.; Puig, P. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 497-501.
- Nawaby, A. V.; Kruus, P.; Dabekzlotorzynska, E. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 401-406.
- Zuriguél, V.; Causse, E.; Bounery, J. D.; Nouadje, G.; Simeon, N.; Nertz, M.; Salvayre, R.; Couderc, F. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 233-238.
- Tuffal, G.; Tuong, A.; Dhers, C.; Uzabiaga, F.; Riviere, M.; Picard, C.; Puzo, G. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1853-1858.