

Dosage des acides gras trans et linoléique conjugués dans la matière grasse du lait par chromatographie gaz-liquide : Comparaison des méthodes et étude de la variation des teneurs en fonction des saisons et de l'altitude

Marius Collomb, Patrick Malke, Monika Spahni, Ueli Bütikofer et Robert Sieber
Station fédérale de recherches laitières (FAM), Liebefeld, CH-3003 Berne

Reçu le 13 août 2002, accepté le 8 septembre 2002

Introduction

La matière grasse (MG) laitière contient de nombreux acides gras trans (AGT) qui sont formés dans le rumen de la vache par biohydrogénation bactérienne des acides polyinsaturés de la MG des fourrages (1). Une méthode de dosage de la composition en acides gras de la matière grasse laitière développée à la FAM permet de doser plus de 25 AGT (2). Ces AGT ont suscité un grand intérêt auprès des spécialistes en nutrition dans les années 90 depuis la parution d'un travail de *Willett et al.* (3). Dans cette étude (Nurses' Health Study) dans laquelle 69181 femmes ont été prises en compte durant huit ans, la consommation en AGT a pu être corrélée significativement avec les maladies cardiovasculaires chez 431 femmes. Cependant, ces corrélations ne concernaient pas les graisses animales dans lesquelles l'acide trans-vaccénique (C18:1 t11) est prédominant mais les graisses végétales hydrogénées dans lesquelles l'acide trans-élaïdique (C18:1 t9) est présent en concentration très élevée. Une autre étude de ce groupe a d'ailleurs démontré plus tard que les AGT d'origine animale n'étaient pas corrélés avec une augmentation des risques cardiovasculaires (4). Un grand nombre d'autres influences des AGT sur le métabolisme comme une élévation du taux de lipoprotéines LDL (Low Density Lipoproteine) dans le sérum du sang ou une augmentation du besoin en acides gras essentiels fut observé (5). Ces effets sont la raison pour laquelle la FDA (Food and Drug Admi-

nistration) (6) a récemment proposé que les teneurs en AGT soient dorénavant indiquées dans les valeurs nutritives des aliments consommés aux Etats-Unis.

Parmi les AGT de la MG laitière, les acides linoléiques conjugués (CLA= Conjugated Linoleic Acids) tels que les isomères C18:2 -cis (c) 9 trans (t)11, -t11 c13, -t9c11, -t9t11, -c10t12, -t10c12, -t10t12 ont été beaucoup étudiés ces dernières années. L'acide octadécadiénoïque c9t11 ou acide ruménique représente à lui seul plus du 82% des CLA de la MG laitière (7). Il se forme par action de la bactérie *Butyrivibrio fibrisolvens* (8) du rumen de la vache sur les acides gras polyinsaturés du fourrage ainsi que de manière endogène par action de la cis Δ 9 désaturase (9) sur l'acide trans-vaccénique dans les tissus de l'homme (10) et des animaux (11). Ces CLA trans ont entre autres des propriétés antiathérogènes et surtout anticancérigènes chez les animaux (11-13). C'est surtout le cas pour l'acide ruménique, considéré comme le composant le plus efficace contre le cancer, en particulier du cancer du sein. Les teneurs en CLA de la MG du lait peuvent être influencées par l'affouragement des vaches, notamment la ration (14), l'addition d'huiles comestibles (14, 15-17) ou de graines de colza ou de soja (18). D'autres facteurs déterminants sont la race des vaches (19), l'âge de l'animal (14), la saison (2, 20, 21) et l'altitude (22).

Le dosage des AGT est habituellement effectué par chromatographie gazeuse (GLC) des esters méthyliques obtenus par transestérification de la MG laitière. Les isomères trans C18:1 (23) doivent d'abord être séparés des isomères cis par chromatographie sur couche mince imprégnée de nitrate d'argent selon la méthode IUPAC 2.208 (24) adaptée par *Ulberth et Henninger* (25) ou par *Molkentin et Precht* (23). Les esters méthyliques des isomères trans C18:2 peuvent être dosés directement sans séparation préalable sur couche mince argentée selon les méthodes de *Precht et Molkentin* (26) ou *Collomb et Bühler* (2). La méthode GLC la plus performante pour le dosage des CLA est celle selon *Precht et Molkentin* (27) qui permet de doser 11 CLA ou mélanges de CLA, dont la plupart ne sont malheureusement pas été identifiés.

Le but du présent travail consiste à doser les teneurs en AGT et en CLA par GLC dans des MG laitières d'hiver de plaine et d'été provenant de diverses altitudes par chromatographie gaz liquide selon trois méthodes complémentaires et à comparer les résultats obtenus.

Partie expérimentale

Provenance des échantillons de MG analysés

Quarante échantillons de MG laitière ont été analysés. Dix échantillons sont des MG produites en hiver. Il s'agit de 10 beurres (de choix et de petit lait) provenant de cinq grandes centrales beurrières suisses. Les trente autres échantillons ont été produits en été. Ils proviennent de lait mélange provenant de 3 altitudes différentes (10 laits produits en plaine à une altitude se situant entre 600 et 650 m, 10 laits produits en zone montagnarde à une altitude se situant entre 900 et 1210 m et 10 laits

produits en zone subalpine à une altitude se situant entre 1275 et 2120 m). Ces 30 laits ont été prélevés dans le cadre d'un projet étudiant les relations existantes entre la composition botanique des pâtures et celle de la matière grasse laitière à différents étages de végétation (28–31). Le nombre de vaches prises en compte était de 45–50 en plaine, quatre à six troupeaux de 10 à 30 vaches en montagne et 57 à 88 vaches à l'étage subalpin.

Méthodes de dosage des acides gras trans et des CLA

Les esters méthyliques des AGT et des CLA ont été dosés par chromatographie gaz-liquide selon trois méthodes différentes:

- a) selon la méthode générale à haute performance selon *Collomb et Bühler* (2) avec laquelle une isolation des AGT sur couche mince argentée est omise (GC direct). Elle permet de doser tous les AGT C18:2 de la MG laitière (C18:2-t9t12; -(c9t13+t8c12); -(c9t12+t8c13) et -(t11c15+t9c12)), les AGT C18:1 les plus représentatifs (trans 4, 5, 6+7+8, 9, 10+11, 12) ainsi que les CLA principaux (C18:2 -(c9t11+c,t/t,c 7,9+8,10)¹; -(c9c11+t11,13) et -t9t11)).
- b) selon la méthode proposée par *Molkentin et Precht* (23) avec un programme de température du four lent (27) qui permet de doser tous les AGT C18:1 (trans 4, 5, 6+7+8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 et 16) après isolation des isomères trans sur couche mince argentée (AgTLC-GC (TLC=thin layer chromatography))².
- c) selon *Precht et Molkentin* (27) (GC direct) qui permet de doser 11 CLA ou mélanges de CLA.

Remarque: Pour le calcul des teneurs en AGT selon b) et des CLA selon c), une méthode générale telle que celle selon a) est nécessaire afin de quantifier le ou les acides gras choisis comme standards internes.

Réactifs

Les réactifs correspondent à ceux indiqués dans les publications des trois méthodes de dosage employées (2, 23, 27).

Appareillage

Etuve thermostatée, environ 50° C. Balance de précision, résolution 1 mg. Plaques de gel de silice 60 en verre, 20×20 cm avec indicateur de fluorescence, épais-

¹Par GC direct, l'acide ruménique ne peut être séparé des isomères 7, 9 et 8, 10. Par mesure de simplification et en accord avec un principe généralement appliqué dans la chimie des MG, on n'indiquera que l'isomère principal (C18:2 c9t11) dans la suite de ce travail.

²Un programme de température du four rapide, non utilisé dans cette étude, permet de séparer les AGT C18:1 4, 5, 6+7+8, 9, 10, 11, 12, 13+14, 15 et 16 de manière convenable en 55 min. Cependant, on peut avoir des problèmes d'intégration pour les AGT C18:1 t10 et t11 dont les pics chromatographiques ne sont pas entièrement séparés l'un de l'autre.

seur de couche: 0,25 mm, (p. ex. Merck, Darmstadt), Linomat III (Camag, Muttenz). Tubes à essai de 10 ml avec fermetures à vis, munis de septa en téflon. Fioles de 2 ml pour passeur d'échantillons, p. ex. Crimp top vial 2-CV et bouchons pour fioles, p. ex. Crimp cap 11-AC-TST 1 (Infochroma, Zoug). Micro-pipettes Capilet-tor 5 et 10 µl (Boehringer Mannheim, Rotkreuz). La même colonne a été utilisée pour les différentes méthodes employées: colonne capillaire Chrompack CP-Sil 88, 100 m, 0,25 mm d.i., épaisseur de film 0,20 µm, domaine de température: 50–240°C, minimum 300000 plateaux théoriques, no art. 7489 (P.H. Stehelin & Cie AG, Bâle). Précolonne: Methyl deactivated non polar, longueur 20 cm, 0,53 mm d. i., Art. no 8009 (P.H. Stehelin & Cie AG, Bâle). Chromatographe en phase gazeuse HP 6890 avec détecteur FID, passeur d'échantillons HP 7673 et logiciel d'évaluation des données HP 3365 Chem Station Upgrade (Hewlett Packard, Urdorf).

Préparation des esters méthyliques d'acides gras

La matière grasse est extraite des produits laitiers selon une norme FIL qui propose des techniques d'extraction rapides (32). La transestérification des graisses en esters méthyliques d'acides gras est effectuée par une solution de KOH dans le méthanol selon la norme FIL (33) en concordance avec *Collomb et Bühler* (2).

Séparation des AGT C18:1 sur couche mince argentée

Cette séparation correspond à celle utilisée par *Molkentin et Precht* (23) avec diverses modifications. C'est pourquoi l'ensemble du processus est décrit ci-après.

Les plaques de gel de silice sont d'abord immergées dans une solution aqueuse de 5 g par 100 ml de nitrate d'argent pendant env. 30 min, séchées à env. 35°C dans une étuve, activées à 120°C pendant 30 min et laissées refroidir à température ambiante (ces plaques doivent être utilisées dans un espace maximal d'une heure). 70 µl d'une solution de 0,5 g de MG transesterifiée dans 5 ml d'hexane obtenus selon *Collomb et Bühler* (2) sont appliqués sous forme de fines bandes de 5 mm de largeur (laisser libre un espace de 1,5 cm par côté) à l'aide du Linomat III. Les AGT sont élués par une solution d'heptane: éther diéthylique 90:10 (v/v) (env. 1 h). Les plaques séchés à l'air dans un endroit sombre sont ensuite vaporisées par une solution de 0,2 g de 2,7-dichlorofluorescéine dans 100 ml d'isopropanol. Les AGT sont visualisés sous lumière UV à 366 nm (trois bandes sont visibles, du haut vers le bas de la plaque de gel de silice : AG saturés, trans puis cis), la bande centrale correspondante aux AGT est marquée au crayon, raclée et extraite 3 fois par 5 ml d'éther diéthylique, suivie chaque fois par une centrifugation rapide de 2 min à env. 500 g. Les extraits combinés sont évaporés à sec à l'aide d'un flux d'azote, le résidu est encore extrait quatre fois avec 250 µl d'éther diéthylique. Les extraits éthers sont introduits dans le flacon d'injection, évaporés à sec et redissous par 80 µl d'heptane. Après fermeture et agitation, on injecte 1,0 µl de la solution (seringue de 5 µl).

Conditions chromatographiques

Comme les conditions chromatographiques peuvent légèrement différer de celles données dans les méthodes, elle sont indiquées ci-dessous.

Pour le dosage des AGT par GC direct selon *Collomb et Bühler* (2)

Gaz porteur : hydrogène. Pression constante à l'entrée de la colonne : 160 kPa (1,5 ml/min, 31 cm/s). Injecteur on column, mode track oven (la température est toujours 3°C plus élevée que la température du four). Détecteur FID, 255°C. Programme de température : 60°C, 5 min, rampe de 14°C/min jusqu'à 165°C, 1 min. à 165°C, rampe de 2°C jusqu'à 225°C, 17 min à 225°C. Temps total : 60 min. Volume injecté : 0,5 µl (seringue de 5 µl).

Pour le dosage des AGT C18:1 par AgTLC-GC selon *Molkentin et Precht* (23)

Gaz porteur : hydrogène. Pression constante à l'entrée de la colonne : 200 kPa (1,6 ml/min, 34 cm/s). Injecteur : 255°C, mode split 100:1. Détecteur : FID, 280°C. Température du four : 120°C, isotherme. Temps total : 270 min. Volume injecté : 1,0 µl (seringue de 5 µl).

Pour le dosage des CLA par GC direct selon *Precht et Molkentin* (27)

Gaz porteur : hydrogène. Pression constante à l'entrée de la colonne : 160 kPa (1,1 ml/min, 27 cm/s). Injecteur 255°C, mode split 100:1. Détecteur FID, 255°C. Programme de température : 125°C, 0 min, rampe de 1°C/min jusqu'à 240°C. Temps total : 115 min. Volume injecté : 1,0 µl (seringue de 5 µl).

Calcul de la composition en AGT et en CLA

Le calcul des résultats obtenus selon *Collomb et Bühler* (2) (en g par 100 g de MG ; standard interne : acide nonanoïque) est donné dans la publication y relative.

Les concentrations en AGT C18:1 selon *Molkentin et Precht* (23) et celles des CLA selon *Precht et Molkentin* (27) sont respectivement calculées par rapport aux concentrations en AGT C18:1 t10 et t11 et en AGT C18:2 c9t11 obtenues selon *Collomb et Bühler* (2) :

$$c(\text{AGTi}) = c(\text{AGTis}) \times \frac{A(\text{AGTi})}{A(\text{AGTis})}$$

$c(\text{AGTi})$ = concentration de l'AGT i à doser en g/100 g de MG

$c(\text{AGTis})$ = concentration de l'AGT utilisé comme standard interne obtenue selon *Collomb et Bühler* (2)

$A(\text{AGTi})$ = surface du pic chromatographique de l'AGT i à doser

$A(\text{AGTis})$ = surface du pic chromatographique de l'AGT utilisé comme standard interne

Précision des trois méthodes employées (2, 23, 27)

La répétabilité (r) a été déterminée à partir des 40 MG laitières analysées à double (80 pesées). Elle a été calculée avec la formule suivante :

$$Sr = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m d_i^2}{2m}}$$

$$r = 2,83 \times Sr$$

Sr = écart-type de la répétabilité

d_i = différences entre les déterminations à double

m = nombre de déterminations à double

r = répétabilité

Analyses statistiques

L'analyse de variance et les comparaisons par paire des valeurs moyennes avec le test Fisher LSD ont été exécutées avec le programme Systat pour Windows, version 9,0.

Résultats et discussion

La figure 1 présente le chromatogramme partiel des AGT C18:1 et C18:2 obtenu selon *Collomb et Bühler* (2), la figure 2 celui des AGT C18:1 selon *Molkentin et Precht* (23) obtenu avec un programme de température lent, la figure 3 le chromatogramme partiel des CLA obtenu selon *Collomb et Bühler* (2) et la figure 4 celui des CLA selon *Precht et Molkentin* (27).

Dans la méthode générale selon *Collomb et Bühler* (2), les AGT C18:2 (fig. 1) peuvent être déterminés sans recouvrement avec des isomères *cis*. Il en est de même pour les AGT C18:1 t 4 à t12. Par contre, le pic des AGT C18:1 t13-14 apparaît à un temps de rétention identique à celui des acides gras C18:1 c6+7+8, celui de l'AGT C18:1 t15 à celui de l'acide oléique (C18:1 c9) présent en concentration élevée dans la MG laitière et celui de l'AGT C18:1 t16 à celui de l'AGT C18:1 c14. Seule la méthode de dosage des AGT C18:1 selon *Molkentin et Precht* (23) (fig. 2) permet un dosage correct de tous les AGT C18:1 avec en plus une séparation des isomères C18:1 t10 et t11 non séparés selon la méthode de *Collomb et Bühler* (2).

Le tableau 1 présente les valeurs de répétabilité pour les AGT C18:1 et C18:2 obtenues selon la méthode de *Collomb et Bühler* (2) comparée à celles analysées pour les AGT C18:1 selon *Molkentin et Precht* (23) et le tableau 2 celles pour les CLA obtenues selon la méthode de *Precht et Molkentin* (27).

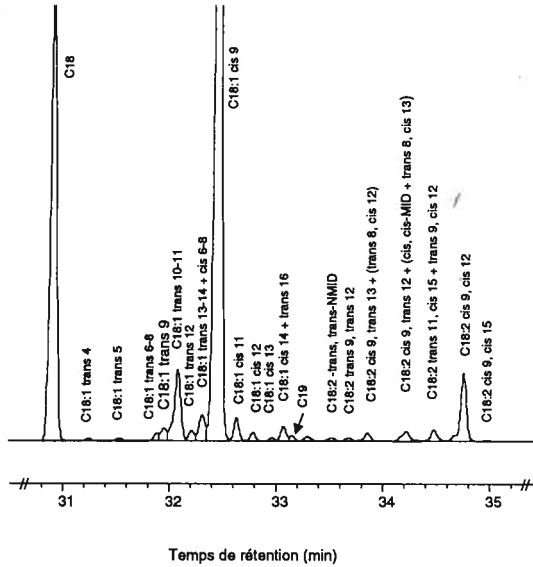


Figure 1 Chromatogramme partiel des acides gras trans C18:1 et C18:2 de la matière grasse du lait obtenu à l'aide de la méthode générale selon *Collomb et Bühler* (2)

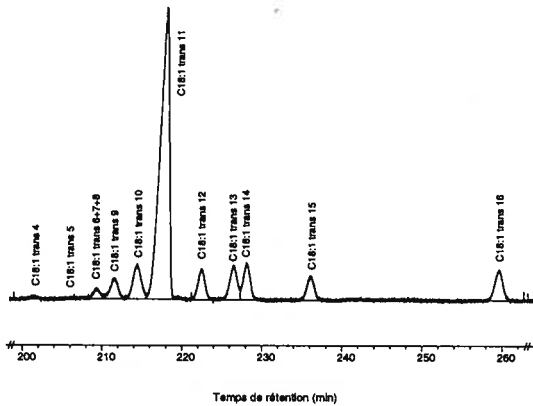


Figure 2 Chromatogramme partiel des acides gras trans C18:1 de la matière grasse du lait obtenu à l'aide de la méthode selon *Molkentin et Precht* (23)

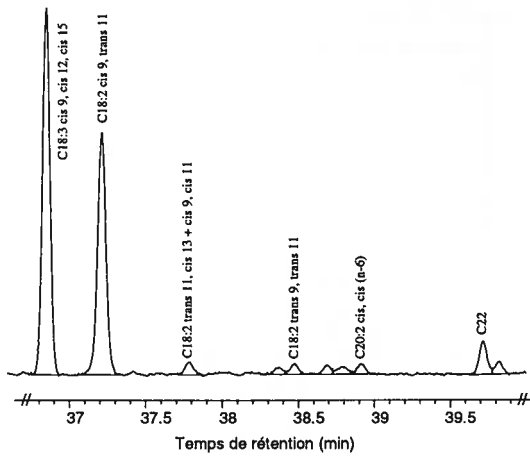


Figure 3 Chromatogramme partiel des acides gras linoléique conjugués (CLA) de la matière grasse du lait obtenu à l'aide de la méthode générale selon Collomb et Bühler (2)

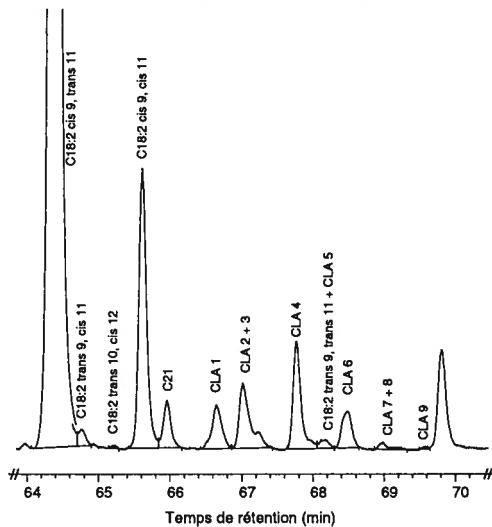


Figure 4 Chromatogramme partiel des acides gras linoléique conjugués (CLA) de la matière grasse du lait obtenu à l'aide de la méthode selon Precht et Molkenlin (27)

La différence absolue entre deux résultats distincts obtenue par le même opérateur avec le même appareillage sur la même graisse de lait dans un court laps de temps ne doit pas dépasser les valeurs de r tabulées pour un intervalle de confiance de 95 %. La norme ISO 15885 (34) spécifie que la différence entre deux déterminations pour des constituants présents à des concentrations supérieures à 5 g/100 g ne doit pas être supérieur à 5 % relatif avec un maximum de 1 g/100 g en absolu. Pour des acides gras présents à des concentrations se situant entre 1 et 5 g/100 g, cette différence ne doit pas excéder 12 % relatif avec un maximum de 0,5 g/100 g en absolu. Nos résultats se situent largement dans le cadre de ces exigences.

Tableau 1
Répétabilité r des teneurs en AGT de la MG laitière selon deux méthodes de dosage (40 paires d'échantillons; g d'acides par 100 g de graisse de lait)

Acide gras trans	Méthode selon	
	Collomb et Bühler (2)	Molkentin et Precht (23)
C14:1 t	0,002	n. d.
C16:1 t	0,011	n. d.
C17:1 t	0,006	n. d.
C18:1 t4	0,006	0,025
C18:1 t5	0,003	0,024
C18:1 t (6+7+8)	0,048	0,076
C18:1 t9	0,070	0,087
C18:1 t10	n. d.	0,067
C18:1 t11	n. d.	0,158
C18:1 t10+11	0,134	n. d.
C18:1 t12	0,026	0,044
C18:1 t13	n. d.	0,083
C18:1 t14	n. d.	0,074
C18:1 t (13+14)+c(6+7+8)	0,044	n. d.
C18:1 t15	n. d.	0,049
C18:1 t16	n. d.	0,097
C18:1 (t16+c14)	0,028	n. d.
C20:1 t	0,009	n. d.
C18:2 ttNMID	0,021	n. d.
C18:2 t9t12	0,008	n. d.
C18:2 c9t13+t8c12	0,024	n. d.
C18:2 c9t12+t8c13	0,027	n. d.
C18:2 t11c15+t9c12	0,021	n. d.
C18:2 c9t11	0,055	n. d.
C18:2 t11 c13+c9c11	0,013	n. d.
C18:2 t9t11	0,010	n. d.
Σ C18:1 trans	0,218 ¹	0,404 ²
Σ trans sans CLA trans	0,281	n. d.
Σ CLA trans ³	0,055	n. d.
Σ C18:2 trans sans CLA trans	0,092	n. d.

Légendes : AGT=acides gras trans ; MG=matière grasse ; t=trans ; c=cis ; CLA=Conjugated linoleic acid ;

ttNMID= trans, trans non methylene interrupted diene ;

¹ Σ C18:1 t4 à t16+c14 ; ² Σ C18:1 t4 à t16 ; ³ Σ C18:2 c9t11, (t11c13+c9c11)+t9t11 ; n. d.=non déterminé.

Tableau 2

Répétabilité r des teneurs en CLA de la MG laitière selon Precht et Molkentin (27)
(40 paires d'échantillons ; g d'acides par 100 g de graisse de lait)

Acides gras trans	Répétabilité r
C18:2 c9t11	0,055
C18:2 t9c11	0,002
C18:2 t10c12	0,001
C18:2 c9c11 (CLA cis)	0,004
CLA n. i. 1	0,003
CLA n. i. 2 + 3	0,004
CLA n. i. 4	0,003
CLA t9t11 + CLA n. i. 5	0,002
CLA n. i. 6	0,004
CLA n. i. 7 + 8	0,003
CLA n. i. 9	0,001
Σ CLA cis et trans	0,068
Σ CLA trans connus ¹	0,055

Légendes: voir tableau 1; ¹ Σ C18:2 c9t11+t9c11+t10c12 ; n. i. =non identifié.

Composition en acides gras trans des MG laitières analysées

Le tableau 3 donne les teneurs moyennes, les écart-types ainsi que les valeurs minimales et maximales des AGT C18:1, C18:2 et des CLA de la MG laitière obtenus par GC direct selon Collomb et Bühler (2) ainsi que des AGT C18:1 obtenus par AgTLC-GC selon Molkentin et Precht (23) pour les 40 MG laitières.

Les AGT C18:1 t4 à t12 étant bien isolés avec les deux méthodes, leurs concentrations devraient être similaires en raison des acides C18:1 t10+11 quantifiés selon Collomb et Bühler (2) servant de standard interne pour doser les AGT selon Molkentin et Precht (23). Avec cette dernière méthode, on remarque cependant des pertes en AGT C18:1 -t6+7+8 et -t9, attribuables à l'isolation des AGT sur couche mince. Toutefois, ces pertes sont faibles (de l'ordre de 0,1 g/100 g de MG) et les sommes des teneurs en AGT C18:1 t4 à t12 de l'hiver à l'été en zone subalpine sont très proches (resp. 2,03, 2,65, 4,47 et 6,19 g/100 g selon Collomb et Bühler (2) et resp. 1,90, 2,55, 4,27 et 6,01 g/100 g selon Molkentin et Precht (23)).

En comparant les résultats obtenus selon les deux méthodes avec ceux de la littérature (tableaux 4 et 5), on remarque que les valeurs pour les périodes hivernale et estivale en plaine et en montagne se situent en général dans les domaines de concentrations obtenues par d'autres auteurs. En zone subalpine cependant, les domaines de concentrations des AGT C18:1 t10+11 (4,65–6,04 g/100 g) et de l'acide ruménique (1,98–2,41 g/100 g) obtenues selon Collomb et Bühler (2) ainsi que de celui de l'acide trans-vaccénique (4,37–5,67 g/100 g) dosé selon Molkentin et Precht (23) se situent nettement en dessus de ceux de la littérature (tableau 4: resp. 0,52–4,26 g/100 g pour le C18:1 t10+11, 0,25–1,95 g/100 g pour l'acide ruménique et 0,52–4,0 g/100 g pour l'acide trans-vaccénique). Les teneurs élevées de la somme des AGT C18:1 aux altitudes élevées (p. ex. en zone subalpine: 7,39 g/100 g de MG

Tableau 3

Composition en acides gras trans des MG de lait mélange d'hiver et d'été (zones collinéenne, montagnarde et subalpine) ;
 (MG d'hiver : $n=10$; MG d'été : $n=10$ par zone) selon les méthodes de Collomb et Bühler (2) et de Molkenin et Precht (23)
 (g/100 g)

Acides gras	MG d'hiver						MG d'été									
	\bar{x}	s_x	Min.	Max.	\bar{x}	s_x	Zone collinéenne (600–650 m)	Zone montagnarde (900–1210 m)	Zone subalpine (1275–2120 m)	Min.	Max.	\bar{x}	s_x	Min.	Max.	
<i>Méthode selon Collomb et Bühler</i>																
C14:1 t	0,01A	0,002	0,01	0,01	0,01A	0,002	0,01	0,02	0,01A	0,002	0,01	0,02	0,01A	0,002	0,01	0,01
C16:1 t	0,08D	0,009	0,07	0,10	0,11C	0,012	0,10	0,13	0,21B	0,018	0,18	0,24	0,32A	0,027	0,27	0,35
C17:1 t	0,01C	0,001	0,01	0,01	0,01C	0,002	0,01	0,01	0,02B	0,002	0,01	0,02	0,03A	0,007	0,02	0,04
C18:1 t4	0,01B	0,002	0,01	0,01	0,01B	0,002	0,01	0,02	0,02A	0,002	0,01	0,02	0,01B	0,002	0,01	0,02
C18:1 t5	0,01B	0,001	0,01	0,01	0,01B	0,001	0,01	0,01	0,01A	0,002	0,01	0,02	0,01B	0,001	0,01	0,01
C18:1 t (6+7+8)	0,10C	0,012	0,09	0,12	0,12C	0,018	0,10	0,14	0,21B	0,024	0,18	0,24	0,25A	0,016	0,17	0,22
C18:1 t9	0,22C	0,013	0,20	0,24	0,21C	0,019	0,19	0,24	0,30A	0,030	0,26	0,36	0,25B	0,016	0,22	0,27
C18:1 t10+11	1,53D	0,132	1,39	1,77	2,09C	0,254	1,76	2,50	3,69B	0,312	3,20	4,16	5,40A	0,393	4,65	6,04
C18:1 t12	0,16D	0,015	0,14	0,18	0,21C	0,035	0,15	0,26	0,24B	0,023	0,18	0,26	0,27A	0,032	0,23	0,32
C18:1 t (13+14)+c(6+7+8)	0,43C	0,032	0,38	0,49	0,73A	0,090	0,60	0,86	0,60B	0,040	0,50	0,64	0,74A	0,095	0,61	0,89
C18:1 t (16+c14)	0,22C	0,019	0,18	0,25	0,35B	0,049	0,26	0,41	0,34B	0,024	0,30	0,38	0,38A	0,034	0,33	0,42
C20:1 t	0,03A	0,004	0,02	0,03	0,03A	0,003	0,02	0,03	0,03A	0,003	0,03	0,03	0,03A	0,003	0,02	0,03
C18:2 t11NMID	0,08D	0,012	0,06	0,10	0,11C	0,017	0,09	0,14	0,16B	0,013	0,15	0,18	0,21A	0,021	0,18	0,26
C18:2 t9t12	0,01B	0,001	0,01	0,01	0,02AB	0,005	0,01	0,02	0,02AB	0,003	0,01	0,02	0,02A	0,002	0,01	0,02
C18:2 e9t13+t8c12	0,16C	0,011	0,14	0,17	0,24B	0,030	0,18	0,28	0,24B	0,014	0,22	0,26	0,31A	0,023	0,27	0,35
C18:2 e9t12+t8c13	0,23D	0,008	0,22	0,24	0,26C	0,028	0,21	0,29	0,28B	0,007	0,27	0,29	0,30A	0,015	0,28	0,33
C18:2 t1c15+t9c12	0,24D	0,036	0,18	0,29	0,34C	0,050	0,26	0,43	0,44B	0,039	0,39	0,50	0,70A	0,120	0,60	0,98
C18:2 e9t11	0,65D	0,079	0,55	0,77	0,78C	0,091	0,67	0,93	1,49B	0,192	1,22	1,81	2,21A	0,145	1,98	2,41
C18:2 e9c11+t11 c13	0,04C	0,012	0,02	0,06	0,04C	0,007	0,03	0,05	0,08B	0,009	0,07	0,10	0,14A	0,028	0,11	0,19
C18:2 t9t11	0,02AB	0,002	0,02	0,03	0,02C	0,004	0,01	0,03	0,03A	0,003	0,02	0,03	0,02B	0,003	0,02	0,03
Σ trans sans les CLA	3,57D	0,185	3,17	3,80	4,83C	0,486	3,95	5,66	6,81B	0,446	5,94	7,41	9,17A	0,653	8,07	10,45
Σ C18:1 trans ¹	2,67D	0,132	2,41	2,85	3,72C	0,379	3,07	4,34	5,41B	0,379	4,68	5,91	7,25A	0,521	6,31	8,15
Σ CLA trans ²	0,71D	0,089	0,60	0,85	0,84C	0,096	0,72	1,01	1,60B	0,201	1,52	1,94	2,37A	0,148	2,15	2,55
Σ C18:2 trans sans CLA	0,72D	0,060	0,62	0,81	0,96C	0,108	0,75	1,14	1,13B	0,062	1,04	1,22	1,54A	0,150	1,42	1,89

Acides gras	MG d'hiver				MG d'été											
	\bar{x}	s_x	Min.	Max. \bar{x}	s_x	Min.	Max. \bar{x}	s_x	Min.	Max.						
<i>Méthode selon Molkenlin et Precht</i>																
C18:1 t4	0,02 ^A	0,006	0,01	0,03	0,02 ^A	0,007	0,01	0,03	0,02 ^A	0,007	0,01	0,04	0,02 ^A	0,006	0,01	0,03
C18:1 t5	0,01 ^B	0,006	0,01	0,03	0,02 ^{AB}	0,006	0,01	0,03	0,02 ^A	0,006	0,01	0,04	0,02 ^{AB}	0,006	0,01	0,03
C18:1 t (6+7+8)	0,04 ^B	0,015	0,02	0,07	0,06 ^{AB}	0,019	0,04	0,11	0,08 ^A	0,029	0,04	0,13	0,07 ^A	0,023	0,03	0,10
C18:1 t9	0,12 ^C	0,020	0,10	0,16	0,11 ^C	0,021	0,09	0,16	0,20 ^A	0,039	0,15	0,26	0,17 ^B	0,031	0,12	0,22
C18:1 t10	0,19 ^C	0,022	0,17	0,22	0,22 ^B	0,024	0,20	0,27	0,34 ^A	0,024	0,30	0,39	0,34 ^A	0,039	0,28	0,41
C18:1 t11	1,34 ^D	0,147	1,19	1,58	1,87 ^C	0,252	1,56	2,29	3,34 ^B	0,298	2,90	3,80	5,07 ^A	0,371	4,37	5,67
C18:1 t12	0,18 ^C	0,029	0,15	0,24	0,25 ^B	0,046	0,17	0,31	0,27 ^B	0,015	0,25	0,31	0,32 ^A	0,040	0,25	0,37
C18:1 t13	0,21 ^C	0,025	0,18	0,27	0,38 ^A	0,055	0,29	0,46	0,31 ^B	0,019	0,27	0,34	0,38 ^A	0,047	0,31	0,44
C18:1 t14	0,21 ^C	0,025	0,16	0,25	0,35 ^{AB}	0,065	0,26	0,43	0,32 ^B	0,020	0,28	0,35	0,38 ^A	0,060	0,27	0,44
C18:1 t15	0,16 ^C	0,012	0,15	0,18	0,26 ^{AB}	0,049	0,18	0,32	0,24 ^B	0,012	0,22	0,26	0,27 ^A	0,036	0,21	0,32
C18:1 t16	0,17 ^C	0,027	0,12	0,20	0,29 ^B	0,070	0,19	0,40	0,30 ^B	0,035	0,21	0,33	0,36 ^A	0,051	0,26	0,42
Σ C18:1 trans	2,65 ^D	0,33	2,25	3,23	3,83 ^C	0,62	3,00	4,81	5,45 ^B	0,51	4,65	6,24	7,39 ^A	0,71	6,13	8,44

Légendes: voir tableau 1. En caractères gras : teneurs croissantes de l'hiver à l'été en plaine et en fonction de l'altitude en été. A>B>C>D= différences significatives ($P \leq 0,05$)

Tableau 4

Revue de la composition en acides gras trans C18:1 et C18:2 dans la MG laitière selon des données bibliographiques (moyennes annuelles) (g/100 g)

Acides gras trans	n	\bar{x}	s_x	Min.	Max.	Références/Pays
C16:1 t	27	0,13	0,05	0,05	0,25	<i>Molkentin et Precht</i> (35)/D
C16:1 t	24	0,11	0,030	0,07	0,15	<i>Wolff</i> (36)/F
C18:1 t4	100	0,05	0,022	0,02	0,13	
C18:1 t5	100	0,05	0,025	0,02	0,12	
C18:1 t (6+7+8)	100	0,17	0,055	0,03	0,30	
C18:1 t9	100	0,24	0,037	0,16	0,31	
C18:1 t10	83	0,17	0,046	0,00	0,26	<i>Precht et Molkentin</i> (41)/D
C18:1 t11	83	1,75	0,985	0,52	4,00	
C18:1 t12	100	0,21	0,043	0,11	0,31	
C18:1 t13+14	100	0,48	0,111	0,25	0,73	
C18:1 t15	100	0,28	0,083	0,10	0,47	
C18:1 t16	100	0,34	0,070	0,16	0,51	
Σ C18:1 trans	1756	3,83	1,344	1,91	6,34	
Σ C18:1 trans	2098	3,70	n.i.	1,29	7,31	<i>Precht et Molkentin</i> (40)/D
Σ C18:1 trans	31	3,33	0,99	1,75	5,20	<i>Henninger et Ulberth</i> (37)/A
Σ C18:1 trans	24	3,75	0,46	2,46	5,18	<i>Wolff</i> (36)/F
C18:2 ttNMID	11	0,19	0,085	0,10	0,38	
C18:2 t9t12	11	0,09	0,023	0,06	0,12	
C18:2 c9t13+t8c12	100	0,11	0,027	0,07	0,16	
C18:2 t9t12+t8c12+c9t13	100	0,22	0,059	0,05	0,37	<i>Precht et Molkentin</i> (26)/D
C18:2 t8c13+ccMID	100	0,11	0,028	0,04	0,20	
C18:2 c9t12	100	0,10	0,026	0,05	0,16	
C18:2 t9c12	100	0,07	0,049	0,02	0,48	
C18:2 t11c15	100	0,33	0,150	0,04	0,68	
C18:2 c9t11	238	0,81	0,392	0,25	1,95	
Σ C18:2 trans sans CLA et C18:2 ttNMID	100	0,99	0,250	0,56	1,58	
Σ C18:2 trans sans CLA et C18:2 ttNMID	1756	0,63	n.i.	0,11	1,41	<i>Precht et Molkentin</i> (40)/D

Légendes: ccMID=cis, cis methylene interrupted diene ; D=Allemagne ; F=France, A=Autriche ; autres légendes : voir tableau 1.

selon la méthode de *Molkentin et Precht* (23) sont surtout dues à celles de l'acide trans-vaccénique (en zone subalpine: 5,07 g/100 g de MG). Selon *Precht et Molkentin* (40), la graisse de lait contient en moyenne 3,70 g/100 g (1,29 à 7,31 g/100 g ; n=2098 MG laitières) d'AGT C18:1 et 0,63 g/100 g (0,11 à 1,41 g/100 g ; n=1756 MG laitières) d'AGT C18:2, CLA trans non compris.

Quant aux influences des saisons et de l'altitude, on remarque pour les deux méthodes que les concentrations en AGT individuels indiqués en caractères gras augmentent significativement ($P \leq 0,05$) de l'hiver à l'été et en fonction de l'altitude durant la période estivale. Les autres AGT individuels sont tous présents en concentrations les plus élevées en zone subalpine, mis à part les AGT C18:1 t6+7+8 et t9 et ceux présents en concentrations de l'ordre de 0,01 à 0,03 g/100 g de MG pour la

Tableau 5

Revue de la composition en acides gras trans (AGT) individuels C18:1 et des Σ en AGT C18:1 et C18:2 dans des MG laitières allemandes produites durant différentes périodes de lactation selon Precht et Molkentin (27)

Acides gras trans	Hiver (n=927) \bar{x} (Min.-Max.)	Transition (n=236) \bar{x} (Min.-Max.)	Été (n=593) \bar{x} (Min.-Max.)	Références	
C18:1 t4	0,05 (0,02-0,07)	0,05 (0,04-0,07)	0,05 (0,03-0,08)	(38)	
C18:1 t5	0,05 (0,02-0,11)	0,04 (0,01-0,06)	0,05 (0,00-0,07)		
C18:1t(6+7+8)	0,13 (0,07-0,20)	0,17 (0,12-0,22)	0,21 (0,16-0,27)		
C18:1 t9	0,21 (0,16-0,29)	0,24 (0,21-0,27)	0,26 (0,20-0,30)		
C18:1 t10	0,16 (0,04-0,33)	0,17 (0,04-0,26)	0,18 (0,03-0,29)		
C18:1 t11	0,93 (0,35-1,96)	1,78 (0,85-2,73)	2,87 (1,45-4,43)		
C18:1 t12	0,19 (0,10-0,26)	0,22 (0,18-0,29)	0,24 (0,19-0,31)		
C18:1 t13-14	0,42 (0,00-0,63)	0,52 (0,38-0,81)	0,57 (0,41-0,85)		
C18:1 t15	0,22 (0,04-0,33)	0,29 (0,18-0,46)	0,37 (0,19-0,48)		
C18:1 t16	0,29 (0,11-0,44)	0,35 (0,21-0,46)	0,39 (0,24-0,52)		
Σ C18:1 trans	2,65 (1,29-4,21)	3,80 (2,71-4,94)	5,08 (3,28-6,75)		
C18:2 c9t11	0,45 (0,10-1,05)	0,76 (0,19-1,19)	1,20 (0,49-1,89)		(39)
Σ C18:2 trans	0,46 (0,11-0,95)	0,66 (0,40-1,14)	0,87 (0,54-1,41)		(40)

Légendes : voir tableau 1.

méthode selon Collomb et Bühler (2) ainsi que de l'isomère C18:1 t6+7+8 pour celle selon Molkentin et Precht (23). Quant aux sommes des concentrations des divers AGT C18:1 et C18:2 ainsi que des CLA, elles augmentent toutes significativement pour les deux méthodes de l'hiver à l'été en plaine et en fonction de l'altitude durant la période estivale. Enfin, on remarque pour les deux méthodes que, mis à part l'AGT C18:1 t9, les teneurs de tous les AGT présents en concentration supérieure à 0,12 g/100 g de MG augmentent significativement de la période hivernale à la période estivale.

Selon Precht et Molkentin (41), la concentration de l'acide trans-vaccénique représente approximativement le 90 % de la concentration totale des 2 isomères C18:1 t10+11 qui ne peuvent pas être séparés sous les conditions chromatographiques proposées par Collomb et Bühler (2). Le résultats présentés dans le tableau 6 confirment les indications de Precht et Molkentin (41) et indiquent en plus

Tableau 6

Part centésimale des teneurs en acide trans vaccénique (C18:1 t11) dans le mélange C18:1 t10+t11

Saison/altitude	Moyenne	Ecart type
Hiver	87,22 ^D	2,321
Été/plaine	89,27 ^C	1,467
Été/montagne	90,66 ^B	0,649
Été/Alpes	93,79 ^A	0,592

Légende : voir tableau 3.

une augmentation significative en passant de l'hiver à l'été et de la plaine en zone subalpine durant la période estivale.

Composition en CLA des MG laitières analysées

La méthode de dosage des AGT C18:1 selon *Molkentin et Precht* (23) rend possible le dosage de tous les AGT C18:1 qui pourrait être exigé pour toutes les denrées alimentaires dans le futur, mais surtout celui de l'acide trans vaccénique, important pour le métabolisme du rumen et de la glande mammaire des vaches (2, 22–43). Les concentrations croissantes des acides trans-vaccénique et ruménique (CLA principal de la MG laitière) de l'hiver à l'été en zone subalpine peuvent être interprétées à l'aide du schéma métabolique récemment élucidé et décrit dans la figure 5 (44).

On constate que l'acide α -linoléique de la MG des fourrages peut être isomérisé en acide ruménique qui est lui-même réduit en acide trans-vaccénique dans le rumen de la vache. L'acide linoléique est aussi un précurseur de l'acide trans-vaccénique mais donne un nombre plus important d'intermédiaires (44). La réduction des C18:1 trans est généralement une étape limitante pour l'hydrogénation complète en acide stéarique, induisant une accumulation ruminale des C18:1 trans. Une partie du CLA provenant de l'hydrogénation ruminale des acides gras polyinsaturés est absorbée au niveau intestinal, prélevée par la glande mammaire et sécrétée dans le lait. La synthèse d'acide ruménique se fait cependant pour plus de 75 % dans la

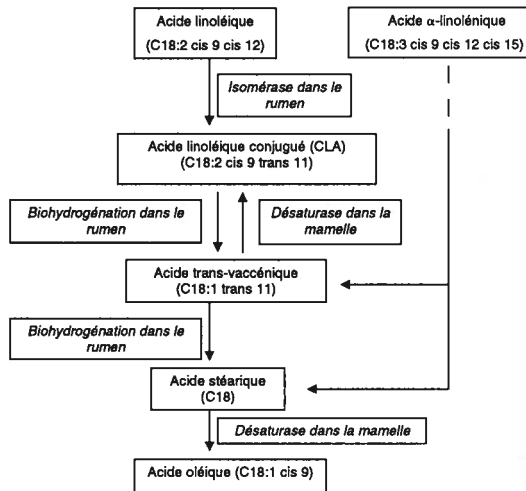


Figure 5 Principales voies de synthèse des acides gras trans et du CLA principal du lait

mamelle mais pour cela, il est nécessaire qu'une quantité suffisante d'acide trans-vaccénique ait été formée dans le rumen. La transformation de l'acide trans-vaccénique en acide ruménique par l'enzyme cis $\Delta 9$ désaturase de la glande mammaire constitue donc l'étape principale de la formation de ce CLA dans le lait (9). L'hydrogénation dans le rumen, généralement définie comme le pourcentage de disparition des acides linoléique et linoléinique entre la bouche et le duodénum est en moyenne de 80 à 92 % (44). Par rapport à l'hiver, les teneurs plus élevées en acides linoléique et linoléinique (45) de la MG des herbages d'été conduit à des teneurs plus élevées en acides gras trans et en CLA dans la MG du lait et ceci au détriment de l'acide stéarique. Les acides gras polyinsaturés ne sont en effet pas synthétisés par les tissus des ruminants, de sorte que leur concentration dépend étroitement des quantités absorbées dans l'intestin et donc des quantités quittant le rumen. Cette quantité peut donc être accrue par l'apport alimentaire et par les facteurs réduisant l'hydrogénation, incluant l'emprisonnement des acides gras dans les cellules végétales (44). Quant à la désaturation de l'acide stéarique en acide oléique, elle a essentiellement lieu dans la glande mammaire.

Le tableau 7 donne les teneurs moyennes, les écart-types ainsi que les valeurs minimales et maximales pour 4 CLA identifiés et 9 CLA inconnus obtenus par GC direct selon la méthode de *Precht et Molkentin* (27) pour les 40 MG laitières. En comparaison, *Precht et Molkentin* (27) ont déterminé des teneurs allant de 0,10 à 1,89 g/100 g de la MG dans 1756 échantillons de lait.

On remarque que les moyennes des teneurs en CLA C18:2 c9t11, n. i. 1 et 4 ainsi qu'en CLA totaux présentées caractères gras dans ce tableau augmentent significativement de l'hiver à l'été et en fonction de l'altitude durant la période estivale. La concentration de l'acide ruménique est naturellement identique à celle obtenue à l'aide de la méthode générale selon *Collomb et Bühler* (2) (tableau 3) en raison l'emploi de cet acide comme standard interne. La somme des CLA est par contre supérieure à celle obtenue à l'aide de la méthode générale en raison du dosage d'un nombre de CLA plus important dont la plupart sont malheureusement non identifiés. Quant à la nature des CLA connus déterminés, cette méthode permet de doser en plus de l'isomère principal, l'acide ruménique, les CLA C18:2 t9c11 et t10 c12 présents en faibles concentrations et non dosés en utilisant la méthode générale. Pour le CLA C18:2 c9c11, sa concentration est identique à celle obtenue pour le mélange C18:2 c9c11+t11 c13 selon la méthode de *Collomb et Bühler* (2) indiquant ainsi une présence probable du deuxième isomère au même temps de rétention. La concentration du CLA t9t11+CLA n. i. 5 est légèrement plus élevée que celle de l'isomère C18:2 t9t11 bien isolé avec la méthode générale en raison des deux isomères qui se superposent.

Tableau 7
Composition en CLA des graisses de lait d'hiver et d'été (zones collinéenne, montagnarde et subalpine ; g d'acides/100 g de MG) (MG d'hiver : n=10 ; MG d'été : n=10 par zone) selon la méthode de *Precht et Molkentin (27)*

Acides gras	MG d'hiver						MG d'été									
	Zone collinéenne (600-650 m)			Zone montagnarde (900-1210 m)			Zone collinéenne (600-650 m)			Zone montagnarde (900-1210 m)			Zone subalpine (1275-2120 m)			
	\bar{x}	s_x	Max.	Min.	Max.	\bar{x}	s_x	Max.	Min.	Max.	\bar{x}	s_x	Max.	Min.	Max.	
C18:2 c9t11	0,649 ^D	0,079	0,550	0,775	0,780 ^C	0,091	0,670	0,935	1,493 ^B	0,193	1,220	1,815	2,211 ^A	0,145	1,975	2,415
C18:2 r9c11	0,008 ^C	0,001	0,007	0,009	0,008 ^C	0,001	0,007	0,009	0,011 ^B	0,001	0,009	0,013	0,015 ^A	0,003	0,011	0,020
C18:2 r10c12	0,003 ^{AB}	0,000	0,002	0,003	0,004 ^A	0,001	0,003	0,005	0,004 ^A	0,001	0,003	0,005	0,002 ^B	0,001	0,002	0,004
C18:2 c9c11	0,041 ^C	0,011	0,025	0,062	0,045 ^C	0,009	0,033	0,062	0,082 ^B	0,008	0,072	0,100	0,140 ^A	0,029	0,108	0,203
CLA n. i. 1	0,018 ^D	0,001	0,015	0,020	0,029 ^C	0,003	0,026	0,036	0,031 ^B	0,001	0,028	0,033	0,039 ^A	0,003	0,033	0,043
CLA n. i. 2+3	0,037 ^C	0,003	0,032	0,040	0,063 ^B	0,008	0,055	0,081	0,059 ^B	0,003	0,055	0,063	0,072 ^A	0,003	0,067	0,076
CLA n. i. 4	0,021 ^D	0,005	0,013	0,027	0,028 ^C	0,004	0,023	0,037	0,041 ^B	0,006	0,033	0,050	0,070 ^A	0,008	0,063	0,086
CLA r9t11 + CLA n. i. 5	0,008 ^B	0,001	0,006	0,010	0,008 ^B	0,001	0,008	0,010	0,010 ^A	0,001	0,009	0,012	0,009 ^A	0,001	0,007	0,010
CLA n. i. 6	0,036 ^B	0,001	0,034	0,037	0,038 ^B	0,006	0,031	0,051	0,044 ^A	0,002	0,040	0,048	0,040 ^B	0,002	0,037	0,043
CLA n. i. 7+8	0,006 ^B	0,002	0,004	0,009	0,007 ^B	0,001	0,005	0,008	0,008 ^A	0,001	0,007	0,009	0,009 ^A	0,001	0,008	0,010
CLA n. i. 9	0,001 ^C	0,000	0,001	0,002	0,001 ^B	0,000	0,001	0,002	0,002 ^B	0,000	0,001	0,002	0,002 ^A	0,000	0,002	0,002
Σ CLA totaux	0,826 ^D	0,097	0,696	0,985	1,010 ^C	0,109	0,893	1,218	1,784 ^B	0,208	1,483	2,133	2,609 ^A	0,156	2,374	2,794

Légendes : voir tableau 1 et 3.

Conclusions

Le présent travail démontre que la méthode générale de dosage des acides gras de la MG laitière proposée par *Collomb et Bühler* (2) permet de doser tous les AGT C18:2 et la plupart des AGT C18:1 de la MG laitière. Cependant, il est nécessaire de disposer en plus d'une méthode complémentaire faisant appel à une séparation des AGT C18:1 sur couche mince argentée pour déterminer correctement l'ensemble de ces AGT. Cela permet d'une part, de pouvoir répondre aux exigences du contrôle des denrées alimentaires et d'autre part, d'obtenir des renseignements concernant le métabolisme du rumen et de la glande mammaire des vaches lors d'essais d'affouragement.

Quant à la méthode de dosage des CLA par chromatographie gaz-liquide selon *Precht et Molkentin* (27), elle n'apporte pas vraiment des connaissances nouvelles par rapport à la méthode générale selon *Collomb et Bühler* (2) en ce qui concerne les différences des teneurs en CLA entre les saisons et en fonction de l'altitude. De plus, de nombreux pics chromatographiques ne sont malheureusement pas identifiés. Des méthodes plus modernes (46, 47) faisant appel à la chromatographie liquide-liquide sur colonne imprégnée de nitrate d'argent ont été récemment développées qui permettent de séparer les CLA en trois séries de pics (C18:2 cis cis; C18:2 cis trans et trans cis et C18:2 trans trans).

Quant aux teneurs en AGT C18:1, C18:2 et en CLA de la MG laitière, elles sont généralement plus élevées en été qu'en hiver et augmentent en fonction de l'altitude en période estivale. Ces résultats sont à corrélérer avec les teneurs plus élevées en acides gras polyinsaturés de la MG des fourrages en été par rapport à l'hiver et en fonction de l'altitude durant la période estivale. Ces acides gras du fourrages sont en effet transformés en acides gras trans dans le rumen de la vache augmentant ainsi les teneurs en AGT et CLA dans le lait.

Résumé

Le présent travail présente les teneurs en acides gras trans et en acides linoléique conjugués (CLA) par chromatographie gaz-liquide dans 40 MG laitières produites en saison hivernale et à trois altitudes différentes en zone estivale selon trois méthodes complémentaires. Les teneurs en acides gras trans et en CLA sont en général significativement plus élevées en été qu'en hiver et augmentent significativement en fonction de l'altitude durant la période estivale. Les méthodes utilisées se complètent de la manière suivante: la méthode générale basée sur une séparation des acides gras sur colonne CP Sil 88 de 100 m permet de doser les acides gras trans et linoléiques conjugués les plus importants de la matière grasse laitière. Cependant, une méthode complémentaire procédant par une séparation préalable des isomères trans C18:1 sur couche mince argentée est nécessaire afin de doser tous les isomères et en particulier l'acide trans-vaccénique en raison de son importance dans le métabolisme des graisses du fourrage dans le rumen de la vache. Pour le dosage des CLA, la méthode par chromatographie gaz-liquide peut être avantageusement remplacée

par une méthode par chromatographie liquide-liquide sur colonnes imprégnées de nitrate d'argent.

Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt die Resultate von trans-Fettsäuren und konjugierten Linolensäuren (CLA) in 40 Milchfettproben, die mit drei sich ergänzenden gaschromatographischen Methoden erhalten wurden. Die Proben stammten aus einer Winterproduktion und von drei verschiedenen Höhenlagen aus Sommerproduktionen. Die Gehalte an trans-Fettsäuren und CLA sind normalerweise im Sommer signifikant höher als im Winter und nehmen in Abhängigkeit zur Höhenlage im Sommer signifikant zu. Die verwendeten Methoden ergänzen sich folgendermassen: Die allgemeine Methode, die auf der Trennung mit einer CP Sil 88-Kapillarsäule von 100 m Länge basiert, erlaubt die wichtigsten trans- und konjugierten Fettsäuren des Milchfettes zu bestimmen. Jedoch ist eine weitere Methode notwendig, die eine Vortrennung der trans-Fettsäuren auf einer mit Silbernitrat imprägnierten Dünnschichtplatte einschliesst. Sie erlaubt, alle C18:1 trans-Isomeren zu trennen, insbesondere die trans-Vaccensäure, die eine zentrale Rolle im Futterfettstoffwechsel im Pansen der Kuh darstellt. Für die Bestimmung der CLA kann heute die in dieser Arbeit verwendete gaschromatographische Methode vorteilhaft durch eine HPLC-Methode mit Silbernitrat imprägnierten Säulen ersetzt werden.

Summary "Analysis of Trans and Conjugated Linoleic Acids (CLA) in Milk Fat using Different Gas-Liquid Chromatographic Methods: Comparison of the Methods and Study of the Variation of the Levels as a Function of the Season and of the Altitude"

This work presents the results of trans and conjugated linoleic fatty acids (CLA) in 40 milk fats produced in winter and at three altitudes in summer using three complementary gas chromatographic methods. The levels of the trans and CLA fatty acids in 40 milk fat samples were significantly higher in summer samples compared to the winter ones and increased during the summer time as a function of the altitude. The methods used were complementary: The general method using a direct separation of the fatty acid on a 100 m CP Sil 88 column allows the determination of the main trans and conjugated fatty acids. However, an other method based on a pre-separation of the trans-C18:1 isomers on silver-impregnated thin layer plate is necessary for the determination of all these isomers and particularly of the trans-vaccenic acid in view of the importance of this latter acid for the fodder fat metabolism of the cow rumen. For the determination of the CLA, the gas chromatographic method used in this work can be now advantageously replaced by a method using liquid liquid chromatography with columns impregnated with silver nitrate.

Key words

Milk fat, Trans fatty acids, CLA, Method, Capillary gas chromatography

Bibliographie

- 1 *Harfoot, C.G. and Hazlewood, G.P.*: Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. (ed.), *The Rumen microbial ecosystem*, 285–322. Elsevier, New York 1988.
- 2 *Collomb, M. et Bühler, T.*: Analyse de la composition en acides gras de la graisse de lait. I. Optimisation et validation d'une méthode générale à haute résolution. *Trav. chim. aliment. hyg.* **91**, 306–332 (2000).
- 3 *Willett, W.C., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Rosner, B.A., Sampson, L.A. and Hennekens, C.H.*: Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet* **341**, 581–585 (1993).
- 4 *Ascherio, A., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Master, C., Stampfer, M.J. and Willett, W.C.*: Trans fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation* **89**, 94–101 (1994).
- 5 *Gurr, M.I.*: Dietary fatty acids with trans unsaturation. *Nutr. Res. Rev.* **9**, 259–279 (1996).
- 6 *Anonyme*: FDA proposes new rules for trans fatty acids in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims. U.S. Department of Health and Human Services, November 12 (1999) (<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/hhtfacid.html>).
- 7 *Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M.W.*: Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* **5**, 185–197 (1992).
- 8 *Kepler, C.R., Hiron, K.P., McNeil, J.J. and Tove, S.B.*: Intermediates and products of the bihydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* **241**, 1350–1354 (1966).
- 9 *Grünari, J.M., Cori, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V. and Bauman, D.E.*: Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *J. Nutr.* **130**, 2285–2291 (2000).
- 10 *Adolf, R.O., Duval, S. and Emken, E.A.*: Biosynthesis of conjugated linoleic acid. *Lipids* **35**, 131–135 (2000).
- 11 *Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H.J., Barbano, D. and Baumann, D.*: Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risks in rats. *J. Nutr.* **129**, 2135–2142 (1999).
- 12 *Parodi, P.W.*: Cow's milk components with anti-cancer potential. *Austr. J. Dairy Technol.* **56**, 65–73 (2001).
- 13 *MacDonald, H.B.*: Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. *J. Amer. Coll. Nutr.* **19**, 111S–118S (2000).
- 14 *Stanton, C., Lawless, F., Kjellmer, G., Harrington, D., Devery, R., Connolly, J.F. and Murphy, J.*: Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* **62**, 1083–1086 (1997).
- 15 *Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P., Albright, K. and Tolosa, M.X.*: Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* **83**, 1016–1027 (2000).
- 16 *Dhiman, T.R., Arnan, G.R., Satter, L.D. and Pariza, M.W.*: Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.* **82**, 2146–2156 (1999).
- 17 *Kelly, M.L., Berry, J.R., Dwyer, D.A., Grünari, J.M., Chouinard, P.Y., van Amburgh, M.E. and Bauman, D.E.*: Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* **128**, 881–885 (1998).
- 18 *Lawless, F., Murphy, J.J., Harrington, D., Devery, R. and Stanton, C.*: Elevation of conjugated cis-9, trans 11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *J. Dairy Sci.* **81**, 3259–3267 (1999).
- 19 *Lawless, F., Stanton, C., L'Escop, P., Devery, R., Dillon, P. and Murphy, J.J.*: Influence of breed on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *Livestock Prod. Sci.* **62**, 43–49 (1999).

- 20 *Parodi, P.W.*: Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* **60**, 1550–1553 (1977).
- 21 *Stanton, C., Lawless, F., Murphy, J. and Connolly, J.F.*: Conjugated linoleic acid – a marketing advantage for animal fats. In: Berger, K. (ed.), *Animal fats: BSE and after*, 27–41. Barnes, Bridgwater 1997.
- 22 *Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Bosset, J.O. and Jeangros, B.*: Conjugated linoleic acid and trans fatty acid composition of cow's milk fat produced in lowlands and highlands. *J. Dairy Res.* **68**, 519–523 (2001).
- 23 *Molkentin, J. and Precht, D.*: Optimized analysis of trans-octadecenoic acids in edible fats. *Chromatographia* **41**, 267–272 (1995).
- 24 *Standard IUPAC 2.208*. International Union of Pure and Applied Chemistry, Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K. 1987.
- 25 *Ulberth, F. and Henninger, M.*: Simplified method for the determination of trans monoenes in edible fats by TLC-GC. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **69**, 829–831 (1992).
- 26 *Precht, D. and Molkentin, J.*: Trans geometrical and positional isomers of linoleic acid including conjugated linoleic acid (CLA) in German milk and vegetable fats. *Fett/Lipid* **99**, 319–326 (1997).
- 27 *Precht, D. and Molkentin, J.*: Analysis and seasonal variation of conjugated linoleic acid and further cis-/trans-isomers of C18:1 and C18:2 in bovine milk fat. *Kieler Milchwirt. Forschungsber.* **51**, 63–78 (1999).
- 28 *Jeangros, B., Troxler, J., Conod, D., Scehovic, J., Bosset, J.O., Bütikofer, U., Gauch, R., Mariaca, R., Pauchard, J.P. et Sieber, R.*: Etude des relations entre les caractéristiques des herbages et celles du lait, de la crème et du fromage de type L'Etivaz ou Gruyère. I. Présentation du projet. *Rev. Suisse Agricult.* **29** (1), 23–34 (1997).
- 29 *Bosset, J.O., Berger, T., Bühler-Moor, U., Bütikofer, U., Collomb, M., Dafflon, O., Gauch, R., Jeangros, B., Lavanchy, P., Mariaca, R., Scehovic, J., Sieber, R. and Troxler, J.*: Comparison of some highland and lowland gruyere-type cheese of Switzerland: a study of their potential PDO/AOC/AOP characteristics. *Proc. Euro Food Chem.* IX, Vol 2, 395–400 (1997).
- 30 *Bosset, J.O., Jeangros, B., Berger, T., Bütikofer, U., Collomb, M., Gauch, R., Lavanchy, P., Scehovic, J., Troxler, J. et Sieber, R.*: Comparaison de fromages à pâte dure de type Gruyère produits en région de montagne et de plaine. *Rev. Suisse Agricult.* **31**(1), 17–22 (1999).
- 31 *Jeangros, B., Scehovic, J., Troxler, J., Bachmann, H.J. et Bosset, J.O.*: Comparaison de caractéristiques botaniques et chimiques d'herbages pâturés en plaine et en montagne. *Fourrages* **159**, 277–292 (1999).
- 32 *FIL/IDF*: Milk and milkproducts. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. (Joint IDF/ISO Standard), provisional norm 172: 1995.
- 33 *FIL/IDF*: Milkfat. Preparation of fatty acid methylesters. (Joint IDF/ISO Standard), provisional norm 182: 1999.
- 34 *Standard ISO Draft 15885*: Milkfat. Determination of the fatty acid composition by gas liquid chromatography (1997).
- 35 *Molkentin, J. and Precht, D.*: Occurrence of trans-C16:1 acids in bovine milkfats and partially hydrogenated edible fats. *Milchwissenschaft* **52**, 380–385 (1997).
- 36 *Wolff, R.L.*: Contribution of trans-18:1 acids from dairy fat to european diets. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **71**, 277–283 (1994).
- 37 *Henninger, M. and Ulberth, F.*: Trans fatty acid content of bovine milk fat. *Milchwissenschaft* **49**, 555–558 (1994).
- 38 *Precht, D. and Molkentin, J.*: Effect of feeding on trans positional isomers of octadecenoic acid in milk fats. *Milchwissenschaft* **52**, 564–568 (1997).

- 39 *Precht, D. and Molkehtin, J.*: Effect of feeding on conjugated cis $\Delta 9$, trans $\Delta 11$ -octadecadienoic acid and other isomers of linoleic acid in bovine milk fats. *Nahrung* **41**, 330–335 (1997).
- 40 *Precht, D. and Molkehtin, J.*: Trans unsaturated fatty acids in bovine milk fat and dairy products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102**, 635–639 (2000).
- 41 *Precht, D. and Molkehtin, J.*: Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. *Int. Dairy J.* **6**, 791–809 (1996).
- 42 *Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B. and Bosset, J.O.*: Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high resolution gas chromatography. *Int. Dairy J.* **12**, 649–659 (2002).
- 43 *Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B. and Bosset, J.O.*: Correlation between fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *Int. Dairy J.* **12**, 661–666 (2002).
- 44 *Chilliard, Y., Ferlay, A. et Doreau, M.* : Contrôle de la qualité nutritionnelles des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières : acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *INRA Prod. Anim.* **14**, 323–335 (2001).
- 45 *Morand-Febr, P. et Tran, G.* : La fraction lipidique des aliments et les corps gras utilisés en alimentation animale. *INRA Prod. Anim.* **14**, 285–302 (2001).
- 46 *Yurawecz, M.P. and Morehouse, K.M.*: Silver-ion HPLC of conjugated linoleic acid isomers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 609–613 (2001).
- 47 *Jahreis, G., Kraft, J., Tischendorf, F., Söhne, F. and von Loeffelholz, C.*: Conjugated linoleic acids: Physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102**, 695–703 (2000).

Adresse du correspondant: Dr Marius Collomb, Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld, CH-3003 Berne. E-mail: marius.collomb@fam.admin.ch