INFORMATION — FAM

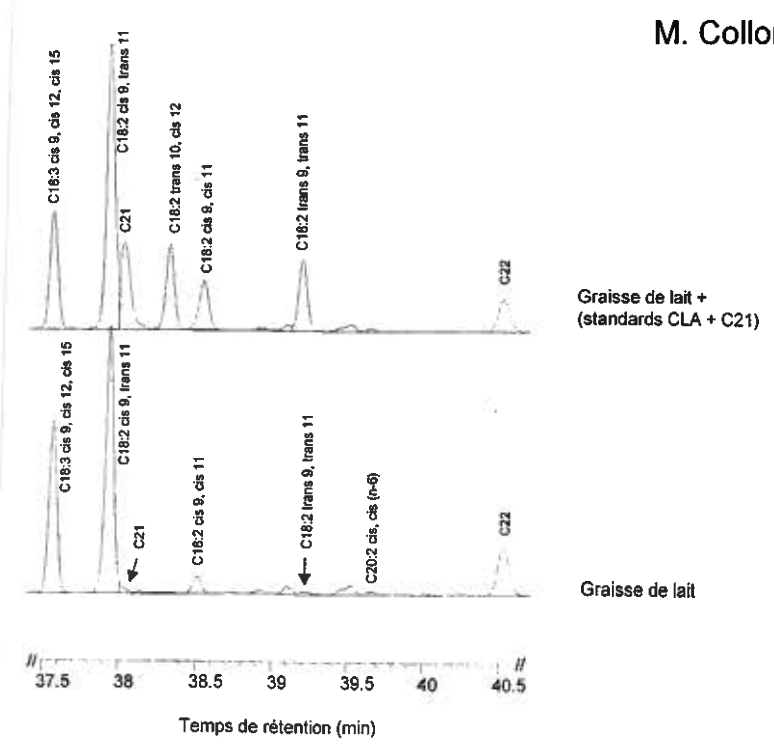
Août 2000 / 405 P/W

Station fédérale de recherches laitières
Liebefeld
CH-3003 Berne

Analyse de la composition en acides gras de la graisse de lait

I. Optimisation et validation d'une méthode générale à haute résolution

M. Collomb et T. Bühler



Mitt. Lebensm. Hyg. 91, 306 – 332 (2000)

Analyse de la composition en acides gras de la graisse de lait

I. Optimisation et validation d'une méthode générale à haute résolution

Marius Collomb et Tina Bühler, Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld, Berne

Présenté le 27 mars 2000, accepté le 7 avril 2000

Introduction

La graisse de lait de vache est composée de glycérides constitués d'environ 400 acides gras différents, dont un grand nombre ont des propriétés physiologiques et nutritionnelles.

L'acide butyrique, uniquement présent dans la graisse de lait des ruminants, est un agent de prévention du cancer (1, 2). Il est essentiellement produit par fermentation bactérienne des fibres et de l'amidon dans le colon. Cet acide induit l'apoptose (mort programmée) des cellules cancéreuses spécialement du colon et du foie (1) en raison de sa haute concentration dans le colon et de son transport rapide dans le foie.

Les acides gras polyinsaturés en général sont des composants importants des membranes cellulaires, modulant leurs propriétés, en particulier l'activité fonctionnelle des enzymes membranaires et le système de transport ionique (3).

Les acides gras en n-3 (oméga 3) et n-6 (oméga 6) ont pour précurseurs les acides linoléique et a-linolénique, qui sont essentiels pour l'être humain (3). Une carence en oméga 3 provoque des troubles de la vision, du comportement et diminue le taux de certaines amines biogènes (noradrénaline, dopamine) ayant des fonctions hormonales. On attribue aux acides gras oméga 3 un effet préventif contre les maladies cardiovasculaires alors que les oméga 6 en augmentent les risques (3). Le défaut de conversion de l'acide linoléique en acide arachidonique est associé à l'hypertension (3, 4). Au cours du temps, le rapport des acides gras oméga 3 : oméga 6 a passé de 1 :1 à environ 1 :20 dans l'alimentation moderne (4) et les nutritionnistes conseillent de revenir au minimum à un rapport de 1 :6, voire de 1 :4 (3). Pour la graisse de lait, ce rapport est normalement d'environ 1 :2.

Les acides gras linoléiques conjugués (conjugated linoleic acids : CLA) ont des propriétés antioxydantes, préventives des maladies cardiovasculaires et surtout anticancéreuses (2, 5, 6). Le mécanisme conduisant à la formation des CLA n'est pas complètement élucidé mais les traitements à chaud (7), l'isomérisation radicalaire de l'acide linoléique (8) ainsi que les réactions microbiennes enzymatiques dans le rumen (9) contribuent à leur formation. Leurs teneurs dans les produits laitiers sont voisines de celles nécessaires aux activités anticancéreuses *in vivo* (2, 10). L'isomère c9t11, qui représente environ 85–90 % des CLA dans la graisse de lait (11), est considéré comme le composant le plus efficace pour la prévention du cancer (2, 6, 12). Le rapport cis 9 trans 11-/cis 9 cis 12- C18 :2 a souvent été utilisé comme instrument diagnostique dans la pathologie clinique (10). Il est possible que des métabolites des CLA (acides gras constitués d'un groupe furane) soient responsables des effets biologiques constatés (6). La graisse de lait peut contenir 0,3–1,8 g de CLA/100 g et la consommation journalière par individu est de 0,3–1,5 g (6).

Les acides gras saturés à moyennes et longues chaînes et insaturés trans (C18 :1 t + C18 :2 avec au moins une double liaison trans) (trans fatty acids : TFA), composés intermédiaires de la biohydrogénation des acides polyinsaturés dans le rumen (13), peuvent augmenter les risques d'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (2, 6, 14). Les acides trans 9- (élaidique) (15) et trans 11- octadécènoïque (t vaccènique) (14) pourraient être des composés bioactifs importants. Quant aux acides gras trans C18 :2, l'isomère t9t12 en particulier altère la biosynthèse des acides polyinsaturés à longue chaîne par inhibition de la D6-désaturase (16, 17) ce qui conduit à une réduction de la synthèse des prostaglandines (18). D'autres isomères trans peuvent également affecter le métabolisme des acides gras essentiels (19, 20). La graisse de lait contient environ 1,6–4,0 g de C18 :1 trans/100 g (6) et selon un groupe d'experts (21), en moyenne 0,5–1,0 g de C18 :2 trans/100 g. Dans les aliments en général, les concentration en acides gras trans ont baissé ces dernières années (22) en raison de l'adaptation des processus technologiques visant à leur réduction, spécialement dans les graisses végétales hydrogénées. La consommation journalière par individu (daily intake) des acides gras trans totaux (C18 :1 + C18 :2) se situe entre 2 et 7 g par jour selon les habitudes alimentaires de divers pays (16). Dernièrement (communiqué de presse de novembre 1999), la *FDA (Food and Drug Administration)* a proposé que les teneurs en acides gras trans soient dorénavant indiquées dans les valeurs nutritives des aliments consommés aux Etats Unis. Il ne faut cependant pas oublier que les risques de maladies coronariennes sont d'abord d'ordre génétique influençant donc essentiellement les personnes à risques (23). Une réduction trop importante en graisse dans l'alimentation peut aussi diminuer la résorption d'autres substances nutritives conduisant à d'autres maladies (23).

Les dosages habituels de la composition en acides gras des graisses sont le plus communément effectués par chromatographie gaz/liquide après transestérification des glycérides en esters méthyliques d'acides gras *(Fatty Acid Methyl Ester : FAME)* (24, 25). On utilise en général ces méthodes pour le dosage des acides gras présents

en concentration relativement importante dans les graisses (> 0,5 g/100 g) c'est à dire entre 16 et 18 acides gras. La séparation est normalement effectuée sur des colonnes capillaires d'environ 30 m de type nitrotéréphtalique ou polyéthylèneglycol tels que *Carbowax 20 M, Supelcowax 10, DB Wax, DB FFAP,* etc... Au vu de l'importance nutritionnelle d'un nombre toujours plus important d'acides gras, il est nécessaire d'employer des colonnes plus performantes, spécialement pour la séparation des CLA, TFA, oméga 3 et oméga 6. Récemment, divers auteurs ont séparé et identifié les TFA et CLA selon diverses techniques (p. ex. RP-HPLC ou Ag^+-TLC + GC-MS + FTIR) sur des colonnes *CP-Sil 88* de 50 m (10, 26–30) puis de 100 m avec encore une meilleure résolution (11, 20, 32). Le mode d'injection *«split»* utilisé pour ces identifications est compréhensible en raison de la volatilité pratiquement identique des acides gras déterminés ou de dosages effectués sur des huiles et graisses non laitières contenant peu d'acides volatils. Pour une méthode universelle permettant le dosage des acides gras de C4 à environ C24, le mode d'injection *«on column»* est préférable en raison des moindres risques de discrimination (33) entre acides gras de volatilités très différentes. Cependant, ce mode d'injection, lié à un programme de température différent, nécessite une vérification de l'identification des pics chromatographiques obtenus en recourant au mode *«split»*.

Le but du présent travail consiste à optimiser et valider une méthode GC capillaire utilisant une colonne *CP-Sil de 100 m* avec injection *«on column»* permettant de doser environ 70 acides gras constitutifs de la graisse de lait. Une telle méthode permettra d'obtenir des informations nouvelles en rapport avec des projets de recherche tels qu'essais d'affouragement, aliments fonctionnels, conséquences nutritionnelles pour l'homme. Ce travail a également pour objectif de déterminer les compositions en acides gras de graisses de lait d'été et d'hiver en Suisse et de comparer les résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs.

Partie expérimentale

Réactifs

n-pentane pour spectroscopie, n-hexane p. a., méthanol p. a., hydrogénosulfate de sodium monohydraté, hydroxyde de potassium p. a., solution de trifluorure de bore/méthanol (20 % in méthanol), p. ex. Merck. Esters méthyliques indiqués dans les tableaux de la présente publication : C4, C5, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C17, C18, C20, p.ex. Merck; C15, C18 :1 cis et trans, C19, C18 :2 trans 9 trans 12, C18 :2 cis 9 trans 12, C18 :2 cis 9 cis 12, C18.3 cis 6 cis 9 cis 12, C20 :1 trans 11, C20 :1 cis 5, C20 :1 cis 9, C20 :1 cis 11, C18 :3 cis 9 cis 12 cis 15, C22, C20 :3 cis 8 cis 11 cis 14 (n-6), C20 :5 cis 5 cis 8 cis 11 cis 14 cis 17 (EPA), C22 :5 cis 7 cis 10 cis 13 cis 16 cis 19 (DPA) et C22 :6 cis 5 cis 7 cis 10 cis 13 cis 16 cis 19, Sigma (Buchs); C18 :2 c9t11, C18 :2 c9c11, C18 :2 t9t11, C18 :2 t10c12 sous forme acide, Matreya inc., 500 Tressler Street, Pleasant Gap, PA 16823 USA (Distributeur: Distrilab BV, Olmenlaan 6-C, 3833 AV Leusden); C7, C12 :1 cis 11, C13, C14 :1 trans 9, C14 :1 cis 9, C16 :1

trans 9, C16 :1 cis 9, C17 :1 trans 10, C18 :1 cis 11, C20 :2 cis 11 cis 14, C20 :3 cis 11 cis 14 cis 17 (n-3), C20 :4 cis 5 cis 8 cis 11 cis 14 (n-6), Nu-Chek-Prep Inc, PO Box 295, Elysian, MN 56028 (Distributeur: Bast of Copenhagen, Biological division, 44 Ingerslevsgade, DK-1705 Copenhagen V); C12 iso, C12 anteiso, C13 iso, C13 anteiso, C14 iso, C14 anteiso, C15 iso, C16 iso, C17 iso, C17 anteiso, Larodan fine chemicals AB, Limhamngardens allé 9, S-21616 Malmö (Distributeur: Socochim SA, Ch. du Trabandan 28, CH-1006 Lausanne).

Estérification des acides gras conjugués (CLA) : Peser 20,0 mg de CLA, ajouter 1,3 ml de solution de BF_3/CH_3OH, chauffer à reflux pendant 2 min., ajouter 1 ml d'heptane et chauffer encore 1 min. à reflux. A la solution refroidie, ajouter 1,3 ml d'une solution saturée de chlorure de sodium, agiter prudemment, pipeter la phase heptane, la sécher sur du sulfate de sodium anhydre. Diluer 5 µl de cette solution dans 1 ml de pentane. Injecter 0,5 µl.

Solution de transestérification: hydroxyde de potassium, 2 mol/l dans le méthanol : dissoudre 11,2 g de KOH dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter avec du méthanol.

Solution de standard interne: dissoudre 0,400 g d'ester méthylique de l'acide octanoïque (C9) dans un ballon jaugé de 50 ml et compléter avec de l'hexane.

Solution de calibrage d'esters méthyliques: Le tableau 1 présente les pesées des esters méthyliques d'acides gras et les masses des formes acides correspondantes.

Tableau 1
Solution de calibrage (esters méthyliques d'acides gras)

Abréviation	*g Méthylester*	*g Acides*
C4	0,370	0,319
C6	0,210	0,187
C8	0,100	0,091
*C9	0,250	0,230
C10	0,250	0,231
C12	0,300	0,280
C14	1,010	0,952
C16	2,700	2,560
C18	1,000	0,953
C18 :1 c9	2,700	2,572

*standard interne

Peser dans un ballon jaugé de 200 ml les esters méthyliques selon le tableau 1 et compléter avec de l'hexane. (La solution peut être ensuite répartie dans de petits flacons étanches et conservée pendant au max. 1 an au réfrigérateur à env. 4 °C.) Pipeter 200 µl dans 10 ml de pentane et injecter 0,5 µl.

Graisse de contrôle: La graisse de contrôle est préparée à partir de beurre pur filtré sur filtre hydrophobe à env. 50° C dans une étuve. Cette graisse, maintenue à env.

50° C, est elle aussi soigneusement mélangée puis répartie en petites portions dans des flacons étanches qui sont entreposés dans un congélateur à env. –20° C. La graisse décongelée et réchauffée à 50° C avant emploi ne sera utilisée qu'une seule fois.

Appareillage

Armoire à sécher, environ 50° C. Balance de précision, résolution 1 mg. Filtres hydrophobes 597 hy ½, Schleicher Schüll (Riehen). Tubes à essai de 10 ml avec fermetures à vis, munis de septa en téflon. Seringue pour passeur d'échantillons p. ex. 5 µl HP 5181-1273 pour injection *on column* dans colonnes capillaires de 0,53 mm de diamètre (précolonne), Hewlett Packard. 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). Agitateur pour éprouvettes, p. ex. Vortex. Dispenseur pour le dosage de l'hexane. Capilettor 5 et 10 µl, Boehringer Mannheim (Rotkreuz). Pipettes de 1 et 5 ml. 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, Basel. Précolonne: «methyl deactivated non polar», longueur 20 cm, 0,53 mm d. i., Art. no 8009, P.H. Stehelin & Cie AG, Basel. 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.

Traitement des échantillons

La matière grasse est extraite des produits laitiers selon une norme FIL qui propose des techniques rapides d'extraction (43). La matière grasse extraite est liquéfiée dans une armoire à sécher entre 45 et 50 °C. Après agitation, on pèse env. 0,500 g de graisse dans un tube à essai de 10 ml. On y ajoute 5,0 ml de la solution de standard interne (C9). On mélange le tout à l'aide d'un vibreur, additionne 0,25 ml de la solution de transestérification, mélange à nouveau et on laisse reposer pendant 5 min à température ambiante. On ajoute 0,5–0,6 g de sulfate de sodium monohydraté solide, mélange à l'aide d'un vibreur, centrifuge pendant 15 min. à env. 1100 g et on transvase la phase supérieure dans une éprouvette (cette solution peut être conservée au réfrigérateur durant plusieurs jours). On en pipette 5 µl dans une fiole de 2 ml du passeur d'échantillons contenant 1 ml de pentane. Après fermeture et agitation, on injecte 0,5 µl de la solution finale.

Conditions chromatographiques

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).

Résultats et discussion

Optimisation des conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques ont été optimisées par injection d'une solution de graisse de lait. La colonne utilisée est relativement stable pour environ 500 injections. Il est à remarquer que le type et la longueur de la précolonne peuvent modifier la résolution des pics. De même, le changement d'une précolonne contaminée permet de prolonger l'utilisation de la colonne. Le critère décisif pour le changement de la précolonne ou/et de la colonne est déterminé par la disparition du pic de l'acide trans 12 octadécènoïque (C18 :1 t12). Le tableau 2 présente la dénomination systématique et triviale des acides gras de la graisse de lait, la figure 1, le chromatogramme général obtenu et les figures 2–4 les chromatogrammes étendus utiles à une reconnaissance aisée des pics.

Tableau 2
Dénomination sytématique et triviale des acides gras de la graisse de lait

Abréviation	*Nomenclature IUPAC* *Acide*	*Nomenclature triviale* *Acide*
C4	butanoïque	butyrique
C5	pentanoïque	valérique
C6	hexanoïque	caproïque
C7	heptanoïque	énanthique
C8	octanoïque	caprylique
C9 SI	nonanoïque	pélargonique
C10	décanoïque	caprique
C10 :1	décènoïque	caproléique
C12	dodécanoïque	laurique
C12 iso	iso- dodécanoïque	–
C12 aiso	aiso- dodécanoïque	–
C12 :1c + C13	cis- dodécènoïque + tridécanoïque	–
C13 iso	iso- tridécanoïque	–
C14	tétradécanoïque	myristique
C14 iso	iso- tétradécanoïque	–
C14 :1 t	trans- tétradécènoïque	t9 : myrisélaidique
C14 aiso	aiso- tétradécanoïque	–
C14 :1 c	cis- tétradécènoïque	c9 : myristoléique
C15	pentadécanoïque	–
C15 iso	iso- pentadécanoïque	–
C16	hexadécanoïque	palmitique
C16 iso	iso- hexadécanoïque	–
C16 :1 t	trans- hexadécènoïque	palmitélaidique
C16 aiso	aiso- hexadécanoïque	–
C16 :1c	cis- hexadécènoïque	c9 : palmitoléique
C17	heptadécanoïque	margarique

Abréviation	*Nomenclature IUPAC Acide*	*Nomenclature triviale Acide*
C17 iso	iso- heptadécanoïque	–
C17 :1 t	trans- heptadécènoïque	–
C17 aiso	aiso- heptadécanoïque	–
C18	octadécanoïque	stéarique
C18 :1 t4	t4- octadécènoïque	–
C18 :1 t5	t5- octadécènoïque	–
C18 :1 t6-8	t6-8- octadécènoïque	t6 : pétrosélaidique
C18 :1 t9	t9- octadécènoïque	élaidique
C18 :1 t10-11	t10-11- octadécènoïque	t11: transvaccènique
C18 :1 t12	t12- octadécènoïque	–
C18 :1 t13-14 + c 6-8	t13-14- + c6-8- octadécènoïque	–
C18 :1 c9	c9- octadécènoïque	oléique
C18 :1 c11	c11- octadécènoïque	vaccènique
C18 :1 c12	c12- octadécènoïque	–
C18 :1 c13	c13- octadécènoïque	–
C18 :1 t16 + c14	c14- + t16- octadécènoïque	–
C19	nonadécanoïque	–
C18 :2 Σ ttNMID	ttNMID- octadécadiènoïque	–
C18 :2 t9t12	t9,t12- octadécadiènoïque	linoélaidique
C18 :2 c9t13 + (t8c12)	c9,t13- octadécadiènoïque	–
C18 :2 c9t12 +(ccMID+t8c13)	c9,t12- octadécadiènoïque	–
C18 :2 t11c15 + t9c12	t11,c15 + t9,c12-octadécadiènoïque	–
C18 :2 c9c12	c9,c12-octadécadiènoïque	linoléique
C18 :2 c9c15	c9,c15-octadécadiènoïque	–
C20	éicosanoïque	arachidique
C20 :1 t	t- éicosènoïque	–
C18 :3 c6c9c12	c6,c9,c12- octadécatriènoïque	g-linolénique
C20 :1 c5	c5- éicosènoïque	–
C20 :1 c9	c9- éicosènoïque	gadoléique
C20 :1 c11	c11- éicosènoïque	gondoïque
C18 :3 c9c12c15	c9,c12,c15- octadécatriènoïque	a-linolénique
C18 :2 c9t11	c9,t11- octadécadiènoïque	ruménique
C18 :2 c9c11	c9, c11- octadécadiènoïque	–
C18 :2 t9t11	t9, t11- octadécadiènoïque	–
C20 :2 c,c (n-6)	c,c- éicosadiènoïque	–
C22	docosanoïque	béhénique
C20 :3 (n-6)	éicosatriènoïque (n-6)	homo-g-linolénique
C20 :3 (n-3)	éicosatriènoïque (n-3)	–
C20 :4 (n-6)	éicosatetraènoïque (n-6)	arachidonique
C20 :5 (EPA) (n-3)	c5,c8,c11,c14,c17-éicosapentaènoïque	timnodonique
C22 :5 (DPA) (n-3)	c7,c10,c13,c16,c19-docosapentaènoïque	clupanodonique
C22 :6 (DHA) (n-3)	c4,c7,c10,c13,c16,c19-docosahexaènoïque	–

Légende:
SI = standard interne
c = cis; t = trans
tt NMID = trans, trans non methylene interrupted diene
cc NMID = cis, cis methylene interrupted diene

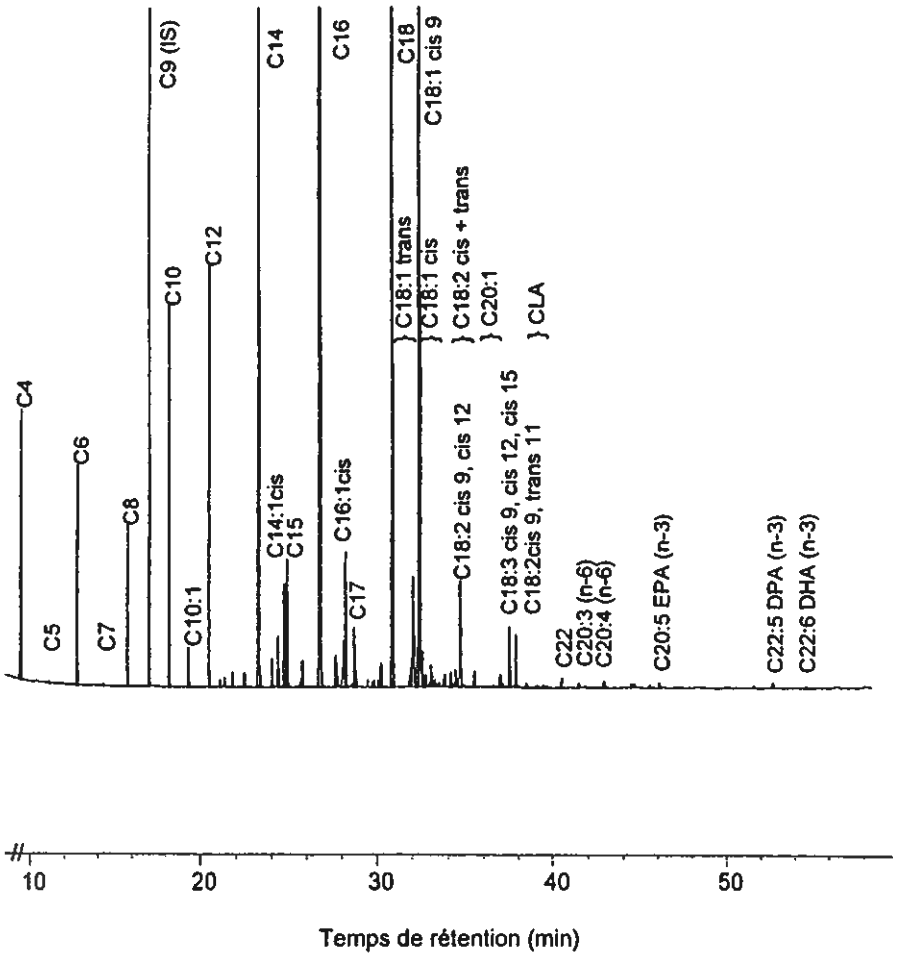


Figure 1 **Chromatogramme général de la composition en acides gras de la graisse de lait de vache**

Identification des pics

L'identification des pics chromatographiques a été effectuée par injection de substances de référence pures et par comparaison avec des chromatogrammes publiés pour des conditions chromatographiques comparables en tenant compte des acides et de leurs concentrations connues dans la graisse de lait. En général, ces concentrations ont confirmé l'identification.

Les acides gras butanoïque (C4) à décènoïque (C10 :1) sont facilement identifiables en raison de la disponibilité des substances de référence, du nombre restreint d'isomères possibles et de leurs concentrations très typées dans la graisse de lait.

Pour les acides gras dodécanoïque (C12) à heptadécanoïque (C17), on retrouve souvent l'ordre d'élution suivant: *acides gras saturés, iso, monoinsaturés trans, anteiso (aiso) et monoinsaturés cis.* La figure 5 présente les chromatogrammes partiels superposés d'une graisse de lait et d'un mélange de standards purs.

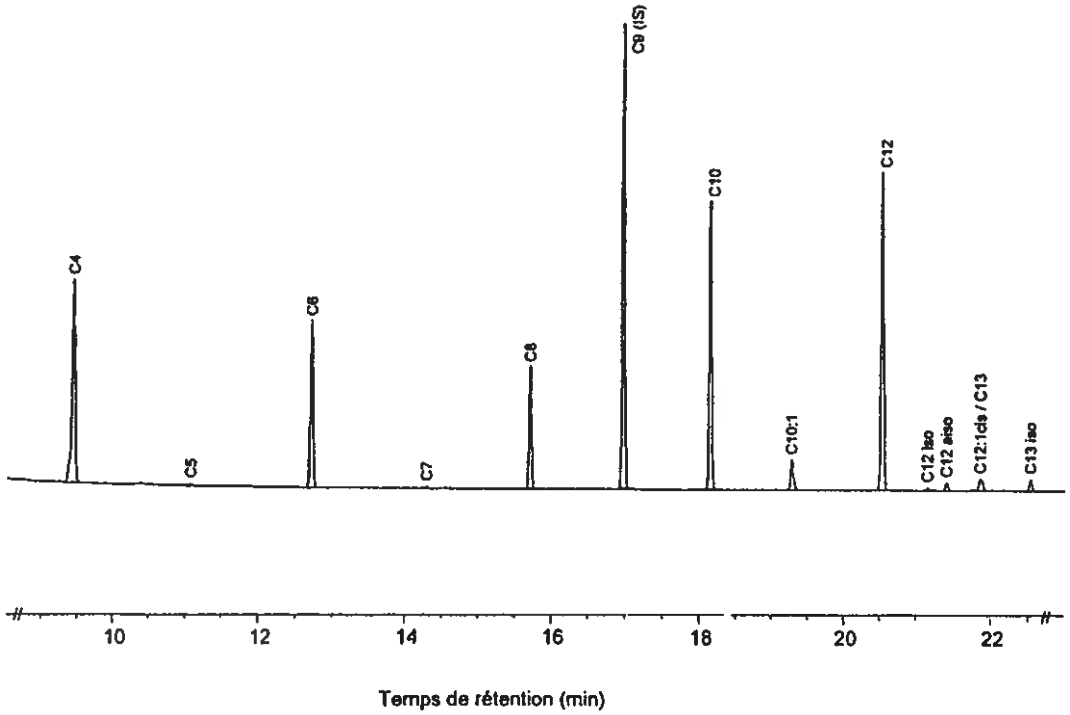


Figure 2 **Chromatogramme partiel des acides gras C4 à C13 iso**

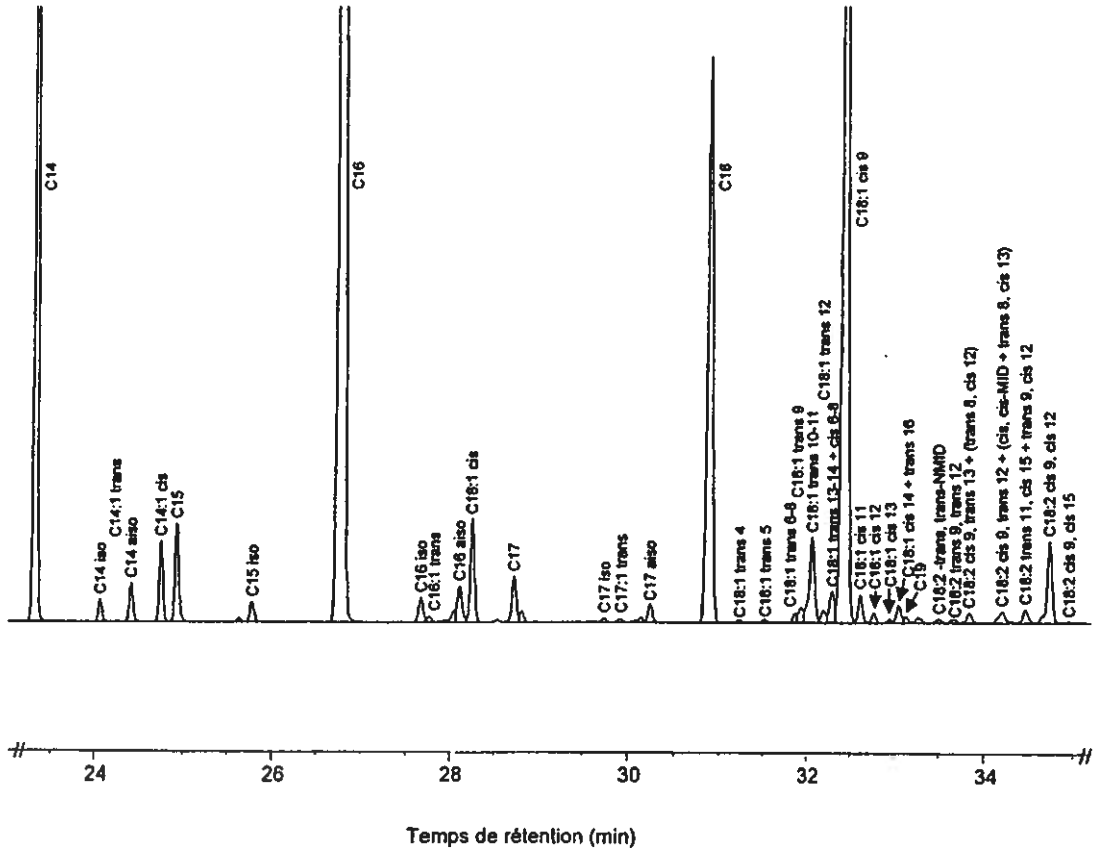


Figure 3 **Chromatogramme partiel des acides gras C14 à C18 :2 cis 9, cis 15**

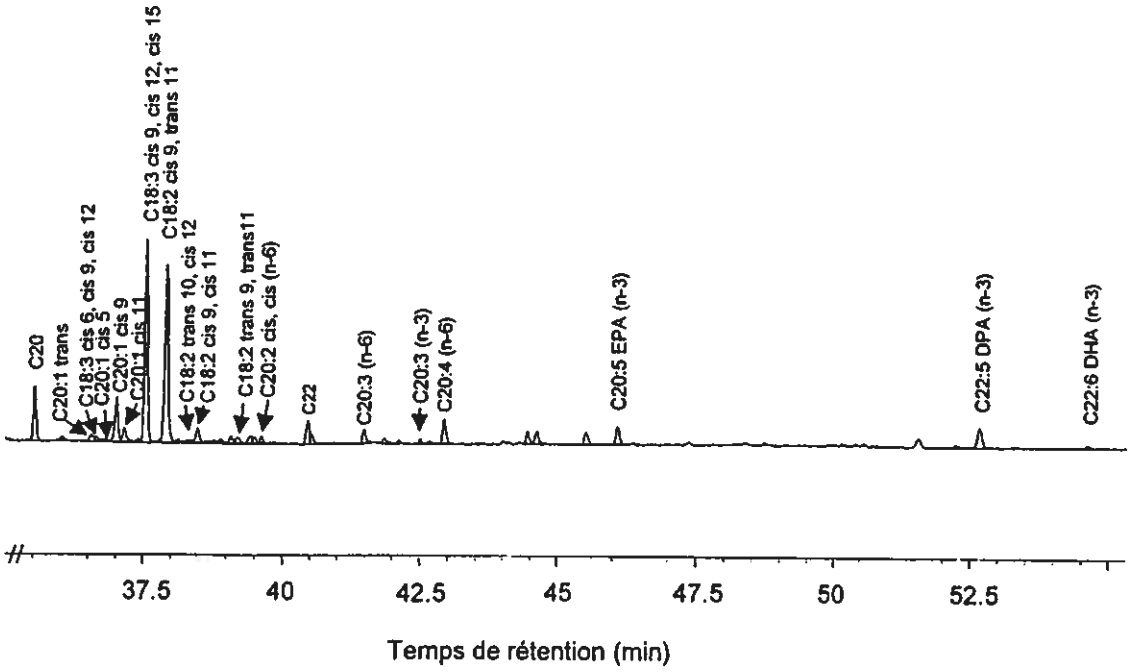


Figure 4 **Chromatogramme partiel des acides gras C20 à C22 :6**

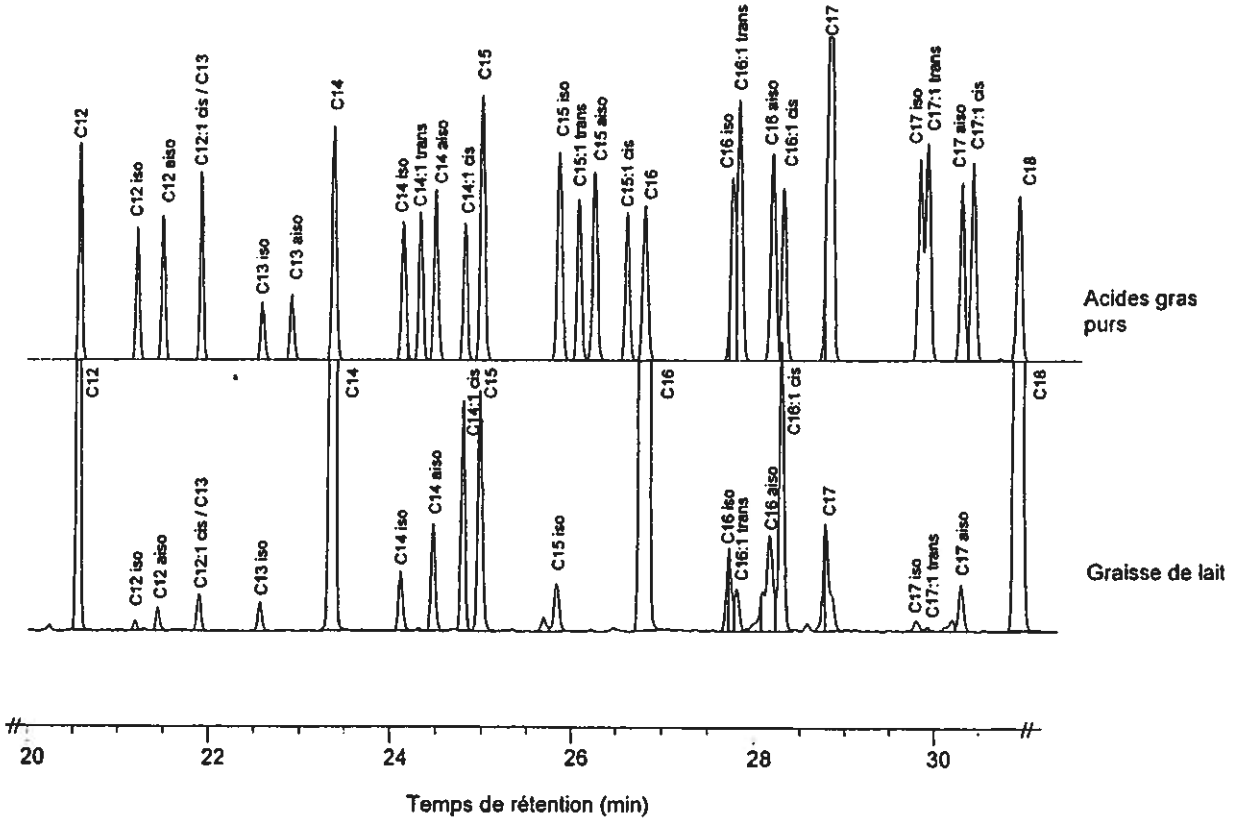


Figure 5 **Chromatogramme partiel des acides gras C12 à C18 la graisse de lait comparé à celui d'un mélange d'acides gras purs**

L'ordre d'élution mentionné ci-dessus est confirmé par injection des acides gras tétra-, penta-, hexa- et heptadécanoïque. Les autres isomères insaturés ne peuvent pas être obtenus dans le commerce. Cet ordre d'élution diffère néanmoins de celui proposé par d'autres auteurs (32) qui ont employé le mode d'injection «split» et une température du four isotherme. Quant à la graisse de lait, l'ordre d'élution est le suivant : C12; C12iso; C12aiso; C12 :1 cis + C13; C13iso; C14 : C14iso; C14 :1 trans; C14aiso, C14 :1 cis, C15, C15iso, C16, C16iso, C16 :1 trans, C16 aiso, C16 :1 cis, C17, C17 iso, C17 :1 trans et C17 aiso. Pour l'identification de l'acide dodécènoïque (C12 :1), on a injecté l'isomère cis 11, pour les acides tétradécènoïque (C14 :1) et hexadécènoïque (C16 :1), les isomères cis 9 et trans 9 et pour l'acide heptadécènoïque (17 :1) les isomères cis 10 et trans 10. Les acides gras C15 aiso, C17 iso et C17 :1 cis, en concentrations négligeables (< 0,05 g/100 g) dans la graisse de lait ont parfois été confondus avec d'autres composés et donc incorrectement dosés (p. ex en concentrations environ 10 fois trop élevées) par divers auteurs (41, 42).

Pour les isomères cis/trans de l'acide octadécènoïque (C18 :1), l'ordre d'élution est connu (26–28, 34–35). Divers auteurs (26–28) ont utilisé la méthode de dosage Ag+-TLC/GC 2.208 de IUPAC (31) adaptée par *Ulberth* et *Henninger* (36) ou par Molkentin et Precht (26) pour la séparation de tous les isomères cis trans C18 :1. Ils séparent d'abord sur couche mince argentée les isomères trans des cis en 2 fractions distinctes. Le dosage par GC sur colonne CP-Sil 88 de 100 m de la fraction trans leur permet de déterminer les isomères trans Δ4, Δ5, Δ6–Δ8, Δ9, Δ10, Δ11, Δ12, Δ13–Δ14, Δ15 et Δ16 et celle de la fraction cis les isomères Δ6–8, Δ9, Δ11, Δ12, Δ13, Δ14 et Δ15 (26). Selon *Precht* et *Molkentin* (34), les concentrations moyennes des isomères trans dans le lait (échantillons analysés = 100) sont respectivement de 0,05, 0,05, 0,17, 0,24 ,0,17, 1,75, 0,21, 0,48, 0,28 et 0,34 g/100 g (total trans: 3,62 g/100 g). Celles des isomères cis sont respectivement de 0,08, env. 18, 0,50, 0,10, 0,07, 0,04 et 0,03 g/100 g (41). La figure 6 compare les isomères cis et trans fractionnés sur couche mince avec ceux obtenus selon notre méthode générale sans fractionnement préalable.

On constate que notre méthode générale, sans fractionnement des formes cis/trans sur couche mince, permet cependant de séparer les isomères principaux. Les acides trans 13-14- et trans 16 C18 :1 ne sont cependant pas séparés des isomères respectifs cis 6-8 et cis 14 et l'acide trans 15 C18 :1 (0,28 g/100 g) ne peut être dosé en raison de son temps de rétention égal au cis 9 C18 :1 (acide oléique). Cependant, les concentrations des acides cis 6-8 C18 :1 sont faibles (0,08 g/100 g) par rapport au trans 13-14 (0,48 g/100 g), de même que celles du cis 14 C18 :1 (0,04 g/100 g) par rapport au trans 16 (0,34 g/100 g). En ce qui concerne l'isomère cis 15 C18 :1, sa concentration de 0,03 g/100 g obtenue après séparation sur couche mince est largement inférieure à celle correspondant au pic mesuré sans fractionnement (env. 0,15 g/100g). En raison d'une contamination possible (probablement avec des ttNMID (trans trans non methylene interrupted diene), l'isomère cis 15 C18 :1 n'est pas indiqué dans nos chromatogrammes. La prochaine publication déterminera

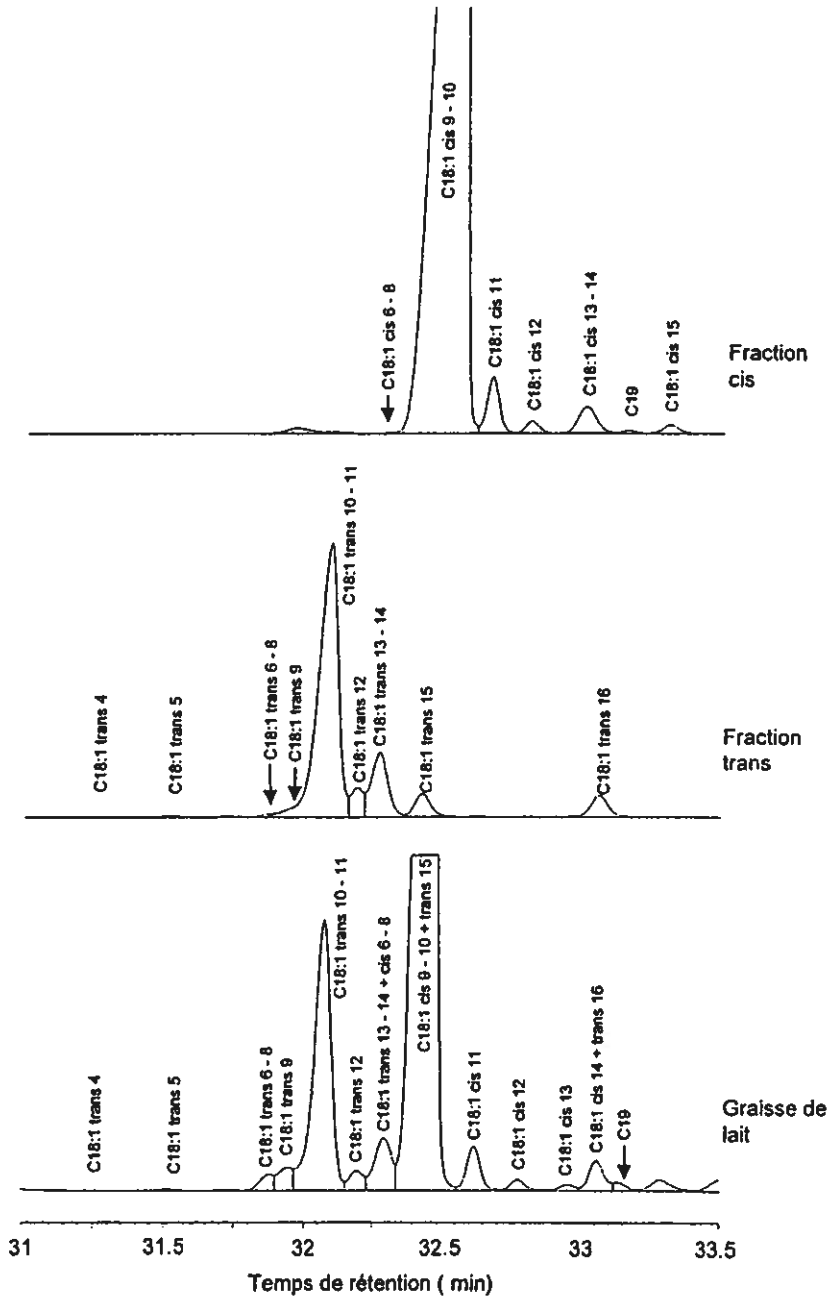


Figure 6 **Chromatogramme partiel des acides gras C18 :1 de la graisse de lait comparé à ceux des acides cis et trans isolés sur couche mince**

dans quelle mesure un fractionnement sur couche mince est nécessaire pour le dosage des acides gras trans. Des régressions linéaires simples donneront la formule à appliquer pour leurs dosages sans fractionnement préalable.

Pour les acides octadécadiènoïques non conjugués (C18 :2), seuls les isomères t9t12, c9t12, t9c12 et c9c12 sont à disposition comme substances de référence. Comme *Precht* et *Molkentin* (20, 34–35), nous avons établi l'identification des pics sur la base des standards existants et des données publiées dans la littérature obte-

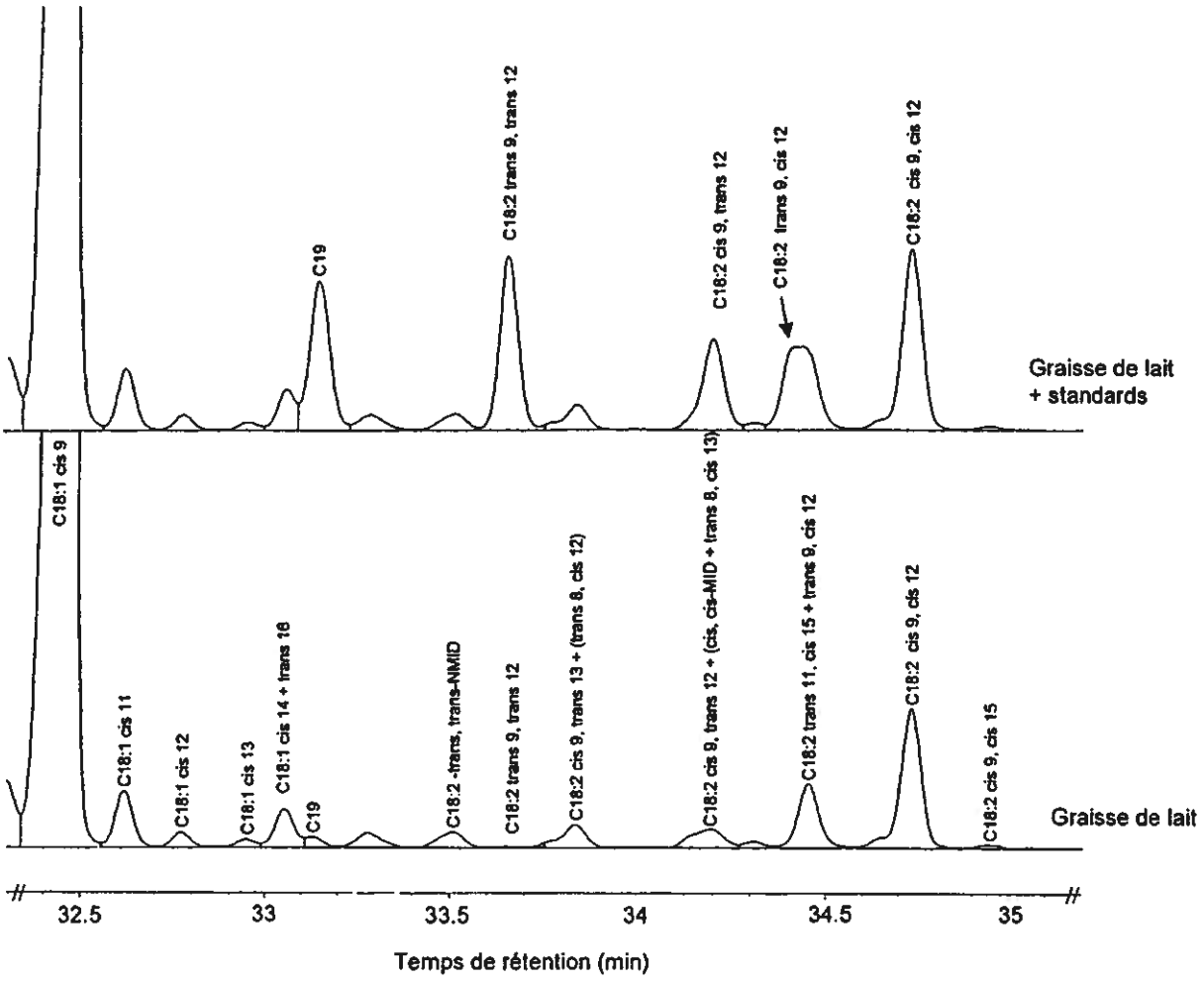


Figure 7 **Chromatogramme partiel des acides gras C18 :2 de la graisse de lait comparé à celui d'un mélange de standards additionnés**

nues par réduction partielle et GC-MS selon *Ratnayake* et *Pelletier* (19) ou par dégradation oxydative selon *Ulberth* et *Henninger* (37). La figure 7 présente les chromatogrammes partiels superposés de la graisse de lait avec et sans standards (les 4 standards susmentionnés + C19).

On constate que les standards sont élués dans l'ordre C19; C18 :2 -t9t12, -c9t12, -t9c12 et -c9c12, ce qui correspond aux données de la littérature pour les pics diènoïques (20, 32). L'identification des isomères trans C18 :2 -c9t13 et -t11c15 a été établie par *Ulberth* et *Henninger* (37) et les isomères majeurs constitutifs des margarines c9t13-, c9t12-, t9c12- et c9c15- ainsi que quelques isomères mineurs (t9t12-, t8c12-, t8c13-, c8c13, t9c15, t10c15 et c9c13 C18 :2) par *Ratnayake* et *Pelletier* (19). L'ordre d'élution dans des huiles hydrogénés déterminé par ces derniers auteurs sur colonne SP 2560 de 100 m est la suivante: ttNMID (5 pics), t9t12-, c9t13-, t8c12-, t8c13-? + ccMID, c9t12-, c8c13-?, t9c12-, t9c15-, t10c15?, c9c13-?, c9c12- et c9c15- C18 :2. Dans la graisse de lait, l'ordre d'élution des pics C18 :2 non conjugués principaux donné par *Precht* et *Molkentin* (colonne CP-Sil 88 de 100 m) (20) est la sui-

vante : tt NMID, C18 :2 -t9t12 + -c9t13 + -(t8c12), -c9t12 + (t8c13? + c,c-MID (cis cis methylene interrupted diene)), -t11c15 + -t9c12, -c9c12 et -c9c15. Les substances indiquées entre parenthèses sont des isomères probables. Les concentrations des isomères diènoïques non conjugués peuvent également confirmer l'identification de certains pics. Dans la graisse de lait (n = 100), elles sont de 0,19 g/100 g (0,10–0,38) pour les ttNMID, de 0,22 g/100 g (0,05–0,37) pour les c9t13 + t9t12 + (t8c12), de 0,21 g/100 g (0,09–0,36) pour le c9t12 + (t8c13 + ccNMID), de 0,40 g/100 g (0,06–1,16) pour le t11c15 + t9c12, de 1,23 g/100 g (0,73–1,74) pour le c9c12 et de 0,08 g/100 g (0,05–0,11) pour le c9c15 (20). L'isomère t11c15 est présent en quantités très variables dans la graisse de lait mais absent dans les margarines. Dans les graisses végétales, le nombre de pics est d'ailleurs fortement réduit (essentiellement C18 :2 c9t12 et t9c12) et l'identification est donc beaucoup plus simple (20). Les concentrations que nous déterminons sont comparables à celles selon *Precht* et *Molkentin* (20) sauf pour les concentrations de l'isomère t9t12 C18 :2, injecté comme standard de référence, qui est bien séparé dans nos conditions et pour lequel nous obtenons des concentrations plus faibles. Si on considère les isomères déterminés avec sûreté, l'ordre d'élution des dienes non conjugués est divisé en 3 groupes géométriques : *trans trans, cis trans/trans cis et cis cis* (19, 29).

L'identification des acides éicosanoïque (C20), éicosènoïque (C20 :1) et octadécatrièenoïque (C18 :3 c6c9c12 et C18 :3 c9c12c15) a été effectuée par injection des standards correspondants. Pour les isomères de l'acide éicosènoïque (C20 :1), nous avons identifié les acides gras C20 :1 -trans 11, -cis 5, -cis 9 et -cis 11. La séquence des isomères cis est en accord avec les données trouvées dans la littérature (32). Le programme de température du four choisi permet d'éluer tous les isomères C20 :1 avant le C18 :3 c9c12c15 (acide a linolénique).

Pour les CLA, l'identification est plus compliquée en raison du grand nombre d'isomères possibles en faibles concentrations et parfois superposés se situant entre les acides gras C18 :3 c9c12c15 et C22. Le programme de température du four choisi est idéal car il permet d'éviter un chevauchement du pic du CLA principal C18 :2 c9t11 par ceux des isomères C20 :1 et d'éluer tous les autres CLA après l'isomère principal. On ne dispose que de 4 substances de référence pures sous forme d'acides (C18 :2 c9t11, t10c12, c9c11 et t9t11 96–98 %) qui ont été estérifiées (BF_3/CH_3OH). *Precht* et *Molkentin* (32) ont démontré que l'ordre d'élution relatif des 4 isomères purs reste le même quelque soit la température du four alors que la position du pic de l'acide hénéicosanoïque (C21) varie et peut donc se superposer à celle des CLA. La figure 8 présente les chromatogrammes partiels superposés d'une graisse de lait avec et sans ajouts de standards (les 4 CLA susmentionnés + C 21).

On constate que l'ordre d'élution est le suivant: C18 :2 c9t11 (isomère principal), C21; C18 :2 -t10c12, -c9c11 et -t9t11. Pour l'identification des CLA en général, une étude bibliographique permet de préciser un ordre d'élution qui peut faciliter la reconnaissance des pics, surtout en raison de son maintien probable en fonction de la température du four du GC (32). Selon divers auteurs (10, 29, 38, 40), un autre

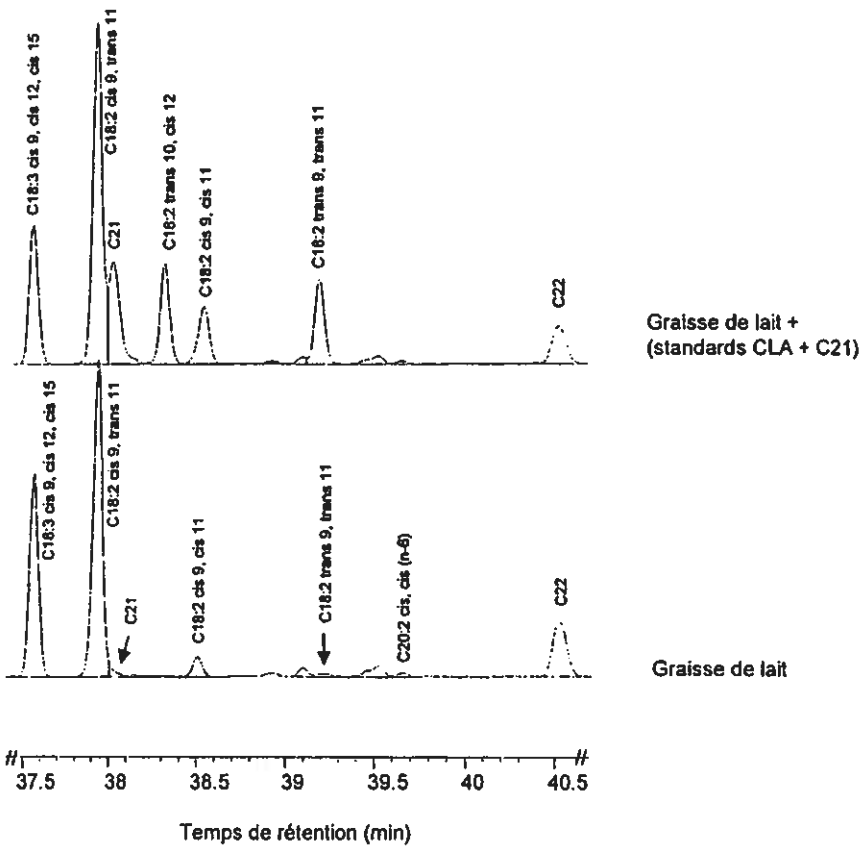


Figure 8 **Chromatogramme partiel des acides gras conjugués (CLA) de la graisse de lait comparé à celui d'un mélange de standards additionnés**

isomère (C18.2 t9c11), en traces dans la graisse de lait et placé directement à droite de l'isomère principal présente probablement dans nos conditions le même temps de rétention que l'acide gras C21. *Ramamurthi* et al. (29) ont identifié divers CLA par GC-MS sur des dérivés DMOX (4,4- diméthyloxazoline) de graisse de castor déshydratée. Ils ont déterminé l'ordre d'élution suivant sur une colonne CP Sil 88 de 50 m: C18 :2 -c9t11, -t9c11, -c10t12, -t10c12, -c9c11, -c10c12, -t9t11et -t10t12. L'isomère C18 :2 -c10t12 est situé entre le -t9c11 et le -t10c12. Dans la graisse de lait, l'ordre d'élution le plus souvent accepté est: C18 :2 -c9t11, -t9c11, -c10t12, -t10c12, -c9c11 et -t9t11. *Lavillonnière* et al. (39) ont déterminé les CLA dans 12 fromages français par RP-HPLC, GC-MS (colonne BPX 70 de 50 m) et GC-FTIR. Ils ont identifié les isomères Δ8Δ10 et Δ11Δ13 avec toutes les configuration cis trans possibles qui peuvent coéluer avec les autres isomères connus: c9t11-, t9c11-, c10t12-, t10c12-, c11c13-, c9c11-, c10c12-, t9t11- et t10t12- C18 :2. Dans la graisse de fromage, une superposition du pic de l'isomère principal C18 :2 c9t11 avec des quantités négligeables des acides gras C18 :2 -c8t10 ou -t8c10, qui peuvent se former par isomérisation microbienne durant la maturation (11, 39), n'est pas exclue. Avec des techniques analytiques semblables, *Sehat* et al. (11) ont identifié sur colonne CP-Sil

88 de 100 m 16 CLA. L'ordre d'élution ainsi confirmé des CLA en 3 groupes géométriques *cis trans/trans cis; cis cis et trans trans* est la suivante: t7c9- + c9t11- + t8c10-, c10t12- + t9c11-, t11c13-?, t10c12- + c12t14-, c7c9- + c8c10- + c9c11-, c10c12- + c11c13- + c12c14-, t12t14-, t11t13-, t10t12- + t9t11- + t8t10- et t7t9-C18 :2. Les temps de rétention des isomères cis trans augmentent en fonction de l'augmentation de la position de la double liaison cis. Pour une même position de la double liaison cis, l'isomère avec le plus petit numéro de la double liaison trans élue en premier. Les temps de rétention des isomères CLA cis cis, respectivement trans trans augmentent en fonction de l'augmentation, respectivement de la diminution de ces positions. Dans la graisse de lait, en dehors de l'isomère principal, les autres CLA ne sont présents qu'en traces. Nous ne doserons dès lors que l'isomère principal C18 :2 c9t11 (0,50–1,70 g/100 g) et les isomères C18 :2 -c9c11 et -t9t11 présents en concentrations encore mesurables (respectivement 0,05–0,10 et 0,02 g/100 g) pour lesquels des substances de référence pures existent.

Parmi les petits pics en fin de chromatogramme, on a pu identifier des acides gras en faibles concentrations dans l'ordre d'élution suivant: acides éicosadiènoïque (C20 :2), docosanoïque (C22), éicosatriènoïques (C20 :3 n-6 puis n-3), éicosatétraènoïque (C20 :4 n-6), éicosapentaènoïque : EPA (C20 :5 c5c8c11c14c17), docosapentaènoïque: DPA (C22 :5 c7c10c13c16c19 et docosahexaènoïque: DHA (C22 :6 c4c7c10c13c16c19. Pour l'identification du C20 :2, on a injecté l'isomère c11c14, pour le C20 :3 n-6, l'isomère c8c11c14, pour le C20 :3 n-3, l'isomère c11c14c17 et pour le C20 :4 n-6, l'isomère c5c8c11c14. Les acides gras insaturés en C20 ont été identifiés en raison de leur importance dans le métabolisme des acides gras chez l'être humain (3).

Calcul des facteurs de correction et de la composition en acides gras

Les facteurs de corrections sont calculés sur la base de la moyenne arithmétique de 3 injections de la solution de calibrage d'esters méthyliques (tableau 1). Pour les esters C4 à C10 ne figurant pas dans la solution de calibrage, on calcule la moyenne arithmétique des facteurs de correction correspondant aux deux pics voisins. Pour les autres pics, on calcule la moyenne des facteurs de correction correspondant aux pics C12 à C18 en raison de valeurs pratiquement identiques.

Les résultats sont donnés en g d'acides gras par 100 g de graisse (standard interne: acide nonanoïque: C9). Le calibrage nécessite donc de calculer les teneurs en acides à partir des pesées des esters méthyliques.

$$Rf_i = \frac{M_i}{S_i}$$

Rf_i = Facteur de correction de l'acide gras i (AGi)
M_i = Masse de l'AGi sous forme acide
S_i = Surface de l'AGi

Les facteurs de correction normés au standard interne C9 = 1,000 sont respectivement d'environ 1,35; 1,25; 1,15; 1,05; 1,00 et 0,90 pour les acides gras C4, C5, C6, C7, C8 et C10 à C24. L'écart-type sur 8 injections est inférieur à 0,01.

Pour le calcul de la composition en acides gras, la teneur en C9 (standard interne) doit aussi être transformée en g d'acide gras.

$$\text{gAG/100 g Graisse} = \frac{Rf_i * S_i * Mis * 100}{Rfis * Sis * P}$$

Rf_i = Facteur de correction de l'acide gras AGi
$Rfis$ = Facteur de correction du standard interne C9 (AGis)
S_i = Surface de l'AGi
Sis = Surface del'AGis
Mis = Masse de l'AGis (C9) en g sous forme acide
P = Pesée de la graisse analysée en g

N.B: La graisse de contrôle est insérée dans chaque série d'échantillons à analyser. Les résultats obtenus doivent être en accord avec les exigences de la norme ISO (24). Il est recommandé d'établir une carte de contrôle (p. ex.: ordonnée: exigences ISO; abscisse: dates des analyses) avec au minimum 3 acides gras (courte, moyenne et longue chaîne) permettant de suivre le bon fonctionnement des dosages (méthode et appareillage) au cours du temps.

Précision de la méthode

Le tableau 3 présente la précision de la méthode obtenue à l'aide de 10 dosages de la même graisse de lait (10 pesées) ainsi que la répétabilité (r) déterminée à partir de 35 graisses de lait différentes analysées à double (17 beurres d'été, 13 beurres d'hiver et cinq beurres d'automne provenant de l'ensemble de la Suisse). La répétabilité a été calculée avec la formule suivante:

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

$$r = 2{,}83 * Sr$$

d_i = différences entre les déterminations à double
m = nombre de déterminations à double

On constate que les coefficients de variation obtenus pour 10 dosages de la même graisse de lait se situent en dessous de 3 % pour des concentrations supérieures à 0,5 g/100 g sauf pour l'acide C16 aiso pour lequel le coefficient de variation

Tableau 3

Précision (10 pesées de la même graisse de lait) et répétabilité r (n = 35 à double) de la méthode (g d'acides par 100 g de graisse)

Abréviation	*Précision*			*Répétabilité r*
	Moyenne	*Ecart-type*	*Coeff. de variation (%)*	
C4	3,23	0,071	2,21	0,327
C5	0,02	0,000	0,00	0,028
C6	2,02	0,026	1,29	0,089
C7	0,04	0,005	15,00	0,007
C8	1,19	0,014	1,20	0,074
C10	2,66	0,044	1,67	0,111
C10 :1	0,29	0,005	1,85	0,018
C12	2,84	0,042	1,49	0,146
C12 iso	0,03	0,000	0,00	0,004
C12 aiso	0,07	0,003	4,45	0,006
C12 :1c + C13	0,14	0,003	2,24	0,011
C13 iso	0,10	0,003	3,13	0,009
C14	9,51	0,154	1,62	0,385
C14 iso	0,24	0,005	1,96	0,018
C14 :1 t	0,01	0,000	0,00	0,004
C14 aiso	0,43	0,008	1,84	0,040
C14 :1 c	0,83	0,013	1,62	0,076
C15	1,00	0,018	1,83	0,081
C15 iso	0,23	0,006	2,73	0,019
C16	23,90	0,431	1,81	0,943
C16 iso	0,39	0,008	2,03	0,042
C16 :1 t	0,18	0,009	5,16	0,029
C16 aiso	0,73	0,031	4,27	0,117
C16 :1 c	1,25	0,035	2,79	0,087
C17	0,67	0,013	1,90	0,176
C17 iso	0,06	0,003	5,36	0,010
C17 :1 trans	0,02	0,000	0,00	0,010
C17 aiso	0,22	0,005	2,14	0,029
C18	8,98	0,181	2,01	0,330
C18 :1 t4	0,01	0,003	28,75	0,134
C18 :1 t5	0,01	0,000	0,00	0,091
C18 :1 t6-8	0,20	0,032	16,41	0,090
C18 :1 t9	0,27	0,022	8,20	0,153
C18 :1 t10-11	3,24	0,106	3,27	0,245
C18 :1 t12	0,20	0,025	12,69	0,115
C18 :1 t13-14 + c 6-8	0,62	0,015	2,45	0,196
C18 :1 c9	17,36	0,319	1,84	0,665
C18 :1 c11	0,43	0,018	4,28	0,027
C18 :1 c12	0,12	0,016	13,39	0,083
C18 :1 c13	0,07	0,007	9,45	0,027
C18 :1 c14+ t16	0,32	0,007	2,08	0,063
C19	0,08	0,009	11,43	0,080
C18 :2 ttNMID	0,17	0,005	2,9678	0,012

Abréviation	Précision			Répétabilité r
	Moyenne	Ecart-type	Coeff. de variation (%)	
C18 :2 t9t12	0,02	0,003	15,06	0,011
C18 :2 c9t13 + (t8c12)	0,26	0,007	2,73	0,018
C18 :2 c9t12 + (ccMID + t8c13)	0,26	0,006	2,45	0,028
C18:2 t11c15 + t9c12	0,55	0,012	2,10	0,029
C18:2 c9c12	1,21	0,023	1,89	0,087
C18 :2 c9c15	0,05	0,003	6,45	0,008
C20	0,16	0,007	4,17	0,014
C20 :1 t	0,03	0,000	0,00	0,075
C18 :3 c6c9c12	0,02	0,004	19,17	0,005
C20 :1 c5	0,02	0,005	32,27	0,003
C20 :1 c9	0,14	0,003	2,28	0,046
C20 :1 c11	0,04	0,003	7,71	0,015
C18:3 c9c12c15	0,86	0,015	1,80	0,056
C18 :2 c9t11	1,44	0,028	1,93	0,077
C18 :2 c9c11	0,10	0,007	7,44	0,011
C18 :2 t9t11	0,02	0,000	0,00	0,025
C20 :2 c,c (n-6)	0,03	0,005	19,66	0,029
C22	0,14	0,008	5,86	0,021
C20 :3 (n-6)	0,05	0,000	0,00	0,007
C20 :3 (n-3)	0,02	0,003	16,64	0,006
C20 :4 (n-6)	0,11	0,004	3,90	0,020
C20 :5 (EPA) (n-3)	0,08	0,005	6,15	0,009
C22 :5 (DPA) (n-3)	0,11	0,003	2,90	0,011
C22 :6 (DHA) (n-3)	0,01	0,000	0,00	0,007

Légende: voir tableau 2

est de 4,27 % ($\bar{x}$: 0,71 g/100 g) et parfois pour les acides gras présents en faibles concentrations (< 0,50 g/100 g).

Répétabilité: La différence absolue entre deux résultats distincts obtenue par le même opérateur sur la même graisse de lait dans un court laps de temps ne doit pas dépasser les valeurs de *r* tabulées dans le 95 % des cas. La norme ISO 15885 (24) spécifie que la différence entre 2 déterminations successives (effectuées par le même opérateur avec le même appareillage et sur le même échantillon) pour des constituants présents à des concentrations supérieures à 5 g/100 g ne doit pas excéder 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 par 100 g, cette différence ne doit pas excéder 12 % avec un maximum de 0,5 g par 100 g en absolu. Nos résultats se situent largement dans le cadre de ces exigences.

Composition en acides gras de beurres d'été et d'hiver suisses

Le tableau 4 donne les valeurs moyennes, maximales, minimales et les écart-types obtenus sur 17 beurres d'été et 17 beurres d'hiver provenant de l'ensemble de la Suisse.

Tableau 4
Composition en acides durant l'été et l'hiver (g d'acides par 100 g de graisse)

Abréviation	*Eté (n = 17)*				*Hiver (n = 17)*			
	Min.	$\bar{x}$	*Max.*	s_x	*Min.*	$\bar{x}$	*Max.*	s_x
C4	2,94	3,09	3,21	0,098	2,95	3,16	3,58	0,168
C5	0,02	0,02	0,02	0,002	0,02	0,02	0,04	0,006
C6	1,91	1,95	2,03	0,031	1,98	2,08	2,34	0,078
C7	0,03	0,03	0,04	0,003	0,02	0,03	0,04	0,005
C8	1,09	1,12	1,19	0,028	1,16	1,20	1,32	0,042
C10	2,26	2,38	2,54	0,081	2,46	2,56	2,75	0,091
C10 :1	0,28	0,30	0,32	0,011	0,28	0,30	0,34	0,013
C12	2,63	2,78	3,00	0,112	2,94	3,12	3,43	0,134
C12 iso	0,03	0,03	0,04	0,002	0,02	0,02	0,03	0,002
C12 aiso	0,07	0,08	0,08	0,003	0,07	0,08	0,09	0,004
C12 :1 + C13	0,13	0,14	0,16	0,009	0,15	0,16	0,17	0,006
C13 iso	0,10	0,10	0,11	0,004	0,11	0,12	0,13	0,006
C14	9,08	9,31	9,63	0,181	9,77	10,35	11,55	0,431
C14 iso	0,23	0,24	0,26	0,008	0,22	0,24	0,27	0,014
C14 :1 t	0,01	0,01	0,01	0,001	0,01	0,01	0,02	0,003
C14 aiso	0,44	0,45	0,49	0,011	0,41	0,44	0,48	0,022
C14 :1 c	0,82	0,86	0,90	0,024	0,79	0,88	0,99	0,051
C15	1,02	1,04	1,11	0,025	1,00	1,11	1,27	0,068
C15 iso	0,22	0,23	0,25	0,010	0,25	0,26	0,29	0,009
C16	22,69	23,52	24,26	0,490	27,26	28,69	32,18	1,236
C16 iso	0,34	0,36	0,38	0,011	0,25	0,30	0,33	0,020
C16 :1 t	0,13	0,19	0,23	0,023	0,07	0,10	0,15	0,024
C16 aiso	0,65	0,73	0,79	0,031	0,45	0,61	0,72	0,072
C16 :1 c	1,14	1,19	1,28	0,040	1,20	1,31	1,44	0,078
C17	0,49	0,63	0,73	0,084	0,37	0,49	0,58	0,064
C17 iso	0,05	0,05	0,06	0,002	0,05	0,06	0,07	0,007
C17 :1 trans	0,01	0,02	0,02	0,002	0,00	0,01	0,02	0,005
C17 aiso	0,21	0,22	0,23	0,006	0,22	0,25	0,29	0,019
C18	7,97	8,32	8,68	0,225	7,36	7,81	8,64	0,358
C18 :1 t4	0,01	0,01	0,03	0,008	0,02	0,03	0,04	0,006
C18 :1 t5	0,01	0,01	0,02	0,003	0,00	0,01	0,01	0,003
C18 :1 t6-8	0,10	0,14	0,19	0,022	0,05	0,07	0,11	0,024
C18 :1 t9	0,24	0,27	0,43	0,043	0,17	0,22	0,29	0,037
C18 :1 t10-11	2,22	3,15	3,54	0,347	1,23	1,44	1,71	0,148
C18 :1 t12	0,12	0,19	0,27	0,054	0,14	0,15	0,17	0,012
C18 :1 t13-14 + c 6-8	0,53	0,59	0,66	0,047	0,28	0,37	0,48	0,055
C18 :1 c9	16,76	17,20	17,91	0,372	15,16	15,74	17,40	0,549
C18 :1 c11	0,40	0,43	0,45	0,014	0,35	0,40	0,45	0,030
C18 :1 c12	0,11	0,12	0,15	0,009	0,11	0,12	0,15	0,014
C18 :1 c13	0,05	0,05	0,09	0,010	0,04	0,05	0,06	0,007
C18 :1 c14+ t16	0,27	0,29	0,34	0,020	0,17	0,23	0,28	0,033
C19	0,04	0,10	0,13	0,023	0,06	0,08	0,12	0,016
C18 :2 ttNMID	0,11	0,16	0,17	0,014	0,05	0,07	0,09	0,010
C18 :2 t9t12	0,01	0,02	0,03	0,003	0,01	0,01	0,02	0,003
C18 :2 c9t13 + (t8c12)	0,24	0,26	0,28	0,010	0,12	0,15	0,17	0,015
C18 :2 c9t12 + (ccMID + t8c13)	0,25	0,29	0,32	0,027	0,21	0,24	0,26	0,015

Abréviation	Eté (n = 17)				Hiver (n = 17)			
	Min.	$\bar{x}$	Max.	s_x	Min.	$\bar{x}$	Max.	s_x
C18 :2 t11c15 + t9c12	0,34	0,52	0,58	0,057	0,17	0,22	0,28	0,035
C18 :2 c9c12	1,10	1,15	1,33	0,051	1,17	1,27	1,42	0,076
C18 :2 c9c15	0,04	0,04	0,05	0,004	0,03	0,04	0,04	0,004
C20	0,13	0,14	0,16	0,011	0,16	0,17	0,19	0,012
C20 :1 t	0,04	0,04	0,05	0,003	0,03	0,04	0,14	0,028
C18 :3 c6c9c12	0,00	0,01	0,01	0,002	0,01	0,01	0,02	0,004
C20 :1 c5	0,01	0,01	0,02	0,002	0,01	0,01	0,01	0,001
C20 :1 c9	0,12	0,13	0,15	0,009	0,13	0,16	0,29	0,037
C20 :1 c11	0,02	0,04	0,05	0,007	0,05	0,05	0,06	0,004
C18 :3 c9c12c15	0,67	0,83	0,92	0,066	0,56	0,69	0,87	0,101
C18 :2 c9t11	1,02	1,44	1,68	0,170	0,53	0,64	0,76	0,073
C18 :2 c9c11	0,05	0,09	0,10	0,012	0,02	0,04	0,06	0,011
C18 :2 t9t11	0,02	0,02	0,06	0,014	0,01	0,02	0,03	0,004
C20 :2 c,c (n-6)	0,02	0,02	0,0	0,002	0,02	0,03	0,03	0,004
C22	0,05	0,06	0,07	0,006	0,04	0,08	0,21	0,039
C20 :3 (n-6)	0,04	0,05	0,06	0,006	0,04	0,05	0,06	0,006
C20 :3 (n-3)	0,01	0,02	0,02	0,002	0,01	0,01	0,02	0,004
C20 :4 (n-6)	0,09	0,09	0,11	0,010	0,09	0,10	0,12	0,010
C20 :5 (EPA) (n-3)	0,07	0,08	0,09	0,004	0,06	0,07	0,09	0,007
C22 :5 (DPA) (n-3)	0,10	0,11	0,12	0,005	0,09	0,10	0,11	0,006
C22 :6 (DHA) (n-3)	0,01	0,01	0,02	0,002	0,01	0,01	0,02	0,002
S courtes chaînes[1]	8,52	8,90	9,35	0,135	8,88	9,36	10,40	0,211
S moyennes chaînes[2]	39,72	41,26	42,98	0,539	44,98	47,80	53,53	1,323
S longues chaînes[3]	34,15	37,46	40,41	0,607	29,42	31,84	36,27	0,702
S saturés[4]	54,67	56,99	59,49	0,605	59,38	63,10	70,64	1,386
Sat. C12, C14 et C16	34,40	35,61	36,89	0,534	39,97	42,16	47,16	1,316
S C18 :1	20,81	22,47	24,09	0,517	17,72	18,84	21,16	0,575
S C18 :2	3,19	4,01	4,62	0,190	2,33	2,71	3,14	0,121
S insaturés[5]	27,58	30,48	33,08	0,558	23,52	25,50	29,09	0,607
S monoinsaturés[6]	23,38	25,26	27,11	0,520	20,29	21,71	24,61	0,586
S polyinsaturés[7]	4,20	5,39	6,16	0,202	3,23	3,79	4,48	0,158
S CLA[8]	1,09	1,55	1,85	0,171	0,57	0,70	0,86	0,084
S C18:1 t[9]	3,22	4,37	5,15	0,358	1,89	2,30	2,82	0,165
S C18:2 t sans CLA t[10]	0,95	1,25	1,38	0,066	0,56	0,70	0,81	0,043
S C18 :2 trans + CLA t[11]	2,00	2,72	3,14	0,183	1,11	1,36	1,61	0,094
Trans total sans CLA t[12]	4,35	5,88	6,83	0,365	2,56	3,17	3,97	0,174
Trans total + CLA t[13]	5,40	7,35	8,60	0,402	3,11	3,83	4,76	0,193
S oméga 3[14]	1,24	1,62	1,79	0,087	0,94	1,15	1,43	0,107
S oméga 6[15]	1,71	1,91	2,27	0,081	1,80	2,02	2,42	0,090

Légende:

Min. = minimum; Max. = maximum; $\bar{x}$ = moyenne; s_x = écart-type

[1]: C4 à C10 :1. [2]: C12 à C16 :1 c. [3]: C17 à C22 :6. [4]: C4 à C10, C12, C12 iso, C12 aiso, C13 iso, C14, C14 iso, C14 aiso, C15, C15 iso, C16, C16 iso, C16 aiso; C17, C17 iso, C17 aiso, C18, C19, C20 et C22. [5]: C10 :1, C14 :1 ct, C16 :1 ct, C17 :1 t, C18 :1 t4 à c14t16, C18 :2 ttNMID à C18 :2 c9c15, C20 :1 t à C20 :2 cc, C20 :3 (n-6) à C22 :6 (n-3). [6]: C10 :1 , C14 :1 ct, C16 :1 ct, C17 :1 ct, C18 :1 t4 à c14-16, C20 :1 t à C20 :1 c11. [7]: C18 :2 -ttNMID à -c9c15, C18 :3 -c6c9c12 +-c9c12c15, C18 :2 -c9t11 à C20 :2 cc, C20 :3 à C22 :6. [8]: CLA total (somme C18 :2 -c9t11, -c9c11, -t9t11). [9]: C18 :1 -t4 à -t13-14. [10]: C18 :2 trans (somme -ttNMID, -t9t12, -c9t13 + (t8c12), -c9t12 + (ccMID + t8c13), -t11c15 + t9c12). [11]: C18 :2 trans + CLA trans (somme -c9t11, -t9t11). [12]: C14 :1t, C16 :1t, C17 :1 t, C20 :1t, C18 :1 trans + C18 :2 trans (sans CLA trans). [13]: C14 :1t, C16 :1t, C17 :1 t, C20 :1t, C18 :1 trans + C18 :2 trans + CLA trans. [14]: C :2 -t11c15 + c9c15, C18 :3 c9c12c15, C20 :3 n-3, C20 :5, C22 :5 et C22 :6. [15]: C18 :1 -t12 + -c12, C18 :2 -t19t12 + c9t12 +-c9c12, C18 :3 c6c9c12, C20 :2 cc, C20 :3 n-6 et C20 :4 n-6.

On constate, comme on pouvait s'y attendre que les teneurs en acides gras à courtes et moyennes chaînes ainsi que ceux qui sont saturés sont plus élevées en hiver qu'en été. Inversement, on observe que les acides gras à longues chaînes et que les insaturés sont dominants en été.

Pour la comparaison des résultats des TFA et CLA, on s'est référé aux résultats obtenus par *Precht* et *Molkentin* (32). Ces auteurs ont analysé les acides gras trans après élimination des isomères cis sur couche mince. Notre méthode générale évite cette étape, ce qui peut engendrer de petites différences dans les résultats.

Selon *Precht* et *Molkentin* (32), les teneurs moyennes mesurées durant l'année des acides gras trans C18 :1 (somme t4-t16) et de trans C18 :2 (sans CLA, somme des t9t12, c9t13, t8c12, t8c13, c9t2, t9c12, t11c15) sont respectivement de 3,62 g/100 g et 0,63 g/100 g. En passant de la période d'hiver à celles de transition et d'été, les teneurs moyennes en trans C18 :1 sont respectivement de 2,65, 3,80 et 5,08 g/100 g et celles en trans C18 :2 de 0,46, 0,66 et 0,87 g/100 g (32). Nos résultats pour les acides gras trans C18 :1 de 2,30 g/100 g (1,89–2,82 g/100 g) pour les beurres d'hiver et de 4,37 g/100 g (3,22–5,15 g/100 g) pour ceux d'été et pour les acides gras trans C18 :2 (sans CLA trans) de 0,70 g/100 g (0,56–0,81 g/100 g) pour ceux d'hiver et de 1,25 g/100 g (0,95–1,38 g/100 g) pour ceux d'été se situent dans le cadre des données bibliographiques. Il est à remarquer que les teneurs en C18 :2 t9t12, isomère particulièrement important comme inhibiteur de la Δ6 désaturase et bien séparé du -c9t13 sous nos conditions chromatographiques, sont inférieures à 0,03 g/100 g durant les 2 saisons et non d'env. 0,10 g/100 g (0,03–0,19 g/100 g) comme signalé par d'autres auteurs (20).

Selon *Precht* et *Molkentin* (32), les teneurs en CLA se situent en moyenne de l'année vers 0,75 g/100 g (0,10–1,89 g/100g), vers 0,45 g/100 g dans la période hivernale, vers 0,76 g/100 g durant la période de transition et à plus de 1,20 g/100g durant la période de pâture d'été. Nos résultats de 0,70 g/100 g (0,57–0,86 g/100 g) durant l'hiver et de 1,55 g/100 g (1,09–1,85 g/100 g) durant l'été confirment les résultats susmentionnés.

Quant aux teneurs en acides gras oméga, on constate que celles en oméga 3 sont plus élevées en été qu'en hiver alors que celles en oméga 6 restent plus ou moins constantes durant les 2 saisons. Le rapport oméga 3 : oméga 6 est d'environ 1 :2 pour la graisse de lait, ce qui correspond à une valeur optimale du point de vue nutritionnel.

Conclusions

En raison de l'importance toujours plus grande accordée aux acides gras dans les denrées alimentaires, particulièrement des nombreux *acides gras trans (TFA), conjugués (CLA), oméga 3* et *oméga 6,* leur dosage par GC sur colonne capillaire *CP-Sil 88* de 100 m avec mode d'injection *«on column»* et programme de température du four peut être recommandé. Par rapport au mode *«split»,* ce mode d'injection permet de diminuer les risques de discrimination entre acides gras de volatilités très dif-

férentes, particulièrement caractéristiques de la graisse de lait. La précision de la méthode proposée se situe largement dans la cadre des exigences mentionnées dans la norme *ISO* 15885 (24). En raison du grand nombre d'acides gras dosés (env. 70), il serait préférable d'employer la nomenclature systématique selon IUPAC, d'ailleurs plus simple à mémoriser, de façon à ne pas mélanger les nomenclatures triviale et officielle dans les rapports d'analyse.

Les ordres d'élution des pics, identifiés sur la base de substances de référence, de recoupements bibliographiques entre divers auteurs en tenant compte des acides gras et de leurs concentrations connues dans la graisse de lait diffèrent parfois de ceux décrits dans la littérature (mode d'injection *«split»* et température isotherme). C'est le cas pour les acides gras C14 à C17 qui, dans nos conditions chromatographiques sont élués dans l'ordre *saturés, iso, monoinsaturés trans, anteiso et monoinsaturés* cis. Leurs concentrations correspondent aux valeurs publiées sauf pour les acides gras C15 aiso, C17 iso et C17 :1 cis, en concentrations négligeables (< 0,05 g/100 g) dans la graisse de lait, faussement identifiés et donc dosés (concentrations environ 10 fois trop élevées) par divers auteurs (41, 42).

Les *TFA* sont relativement bien séparés sur une colonne de 100 m et nos résultats correspondent aux valeurs publiées. On peut toutefois constater des différences dues au fait que les résultats ont été obtenus avec des dosages moins précis dans le cadre du présent travail puisqu'ils n'ont pas requis l'élimination préalable des isomères cis sur couche mince. Ces différences doivent être aussi relativisées en raison de données physiologiques lacunaires, leurs auteurs n'étant pas encore à même d'identifier clairement tous les acides gras trans à risques du point de vue cardiovasculaire. Parmi les acides gras trans C18 :2, l'isomère t9t12 C18 :2, un des inhibiteurs reconnus de la Δ6 désaturase, est bien séparé de l'isomère c9t13 C18 :2. Sa concentration dans la graisse de lait est en fait négligeable (env. 0,03 g/100 g) et non d'env. 0,10 g/100 g, valeur incorrecte (32) due à une mauvaise séparation chromatographique de l'isomère c9t13 C18 :2 (32).

Pour les *CLA*, on obtient des résultats comparables à ceux indiqués dans la bibliographie récente. En général, les augmentations souhaitables de leurs teneurs dans les beurres d'été sont malheureusement accompagnées de celles, indésirables, des teneurs en acides gras trans C18 :1 et trans C18 :2 (32). Les acides gras *oméga 3* et *oméga 6* sont présents en concentrations respectives de 0,9–1,8 g et 2 g d'acides par 100 g de graisse et le rapport oméga 3 : oméga 6, inférieur à 2 :1 est considéré comme optimal du point de vue nutritionnel.

Quant aux compositions en acides gras de beurres d'hiver et d'été provenant de l'ensemble de la Suisse, elles ne se différencient pas de celles obtenues dans d'autres pays européens.

Remerciements

Les auteurs remercient Madame *Monika Spahni* pour la préparation des figures et Messieurs *R. Daniel* et *J.O. Bosset* pour la lecture du manuscrit.

Résumé

Une méthode de dosage de la composition en acides gras (env. 70 acides gras) de la graisse de lait par GC sur colonne capillaire *CP-Sil 88* de 100 m avec mode d'injection *«on column»* a été optimisée et validée selon la norme *ISO* 17025. Ce mode d'injection a été choisi en raison des risques moindres de discrimination par rapport au mode *«split»* entre acides gras de volatilités très différentes particulièrement caractéristiques de la graisse de lait. Les pics ont été identifiés sur la base de substances de référence, de recoupements bibliographiques entre divers auteurs en tenant compte des acides gras et de leurs concentrations connues dans la graisse de lait. Les acides gras C14 à C17 sont élués dans l'ordre *saturés, iso, monoinsaturés trans, anteiso et monoinsaturés cis.* Leurs concentrations correspondent aux valeurs connues sauf pour quelques acides gras iso, anteiso et cis bien séparés et identifiés dans nos conditions dont les concentrations sont parfois nettement différentes de celles indiquées dans la bibliographie. L'isomère C18 :2 t9t12, un des inhibiteurs reconnus de la Δ6 désaturase, est par exemple nettement séparé de l'isomère c9t13 C18 :2 et sa teneur dans la graisse de lait est inférieure à celle publiée. Pour les comparaisons entre beurres d'été et d'hiver suisses, les résultats obtenus sont comparables à ceux des autres pays européens.

Zusammenfassung

Eine Methode für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Milchfett (ung. 70 Fettsäuren) mittels Gaschromatographie auf einer 100 m langen Kapillarsäule *CP Sil 88* wurde optimiert und nach *ISO* 17025 validiert. Als Einspritzverfahren wurde die *«on column»* Einspritzung aufgrund der kleineren Diskriminierungsrisiken gegenüber der *«split»* Technik gewählt. Dies ist besonders wichtig für Milchfett, wegen der stark unterschiedlichen Flüchtigkeit der Fettsäuren. Die zahlreichen Peaks wurden auf Basis der Referenzsubstanzen und nach den Literaturangaben zwischen verschiedenen Autoren unter Berücksichtigung der typischen bekannten Fettsäuren und deren Konzentrationen im Milchfett identifiziert. Die Fettsäuren C14 bis C17 sind in der Reihe *gesättigt, iso, monoungesättigt trans, anteiso und monoungesättigt cis* eluiert. Für einige dieser Fettsäuren wurden in der Literatur zu hohe Gehalte angegeben. Mit unserer Methode kann das Isomer C18 :2 t9t12, eine der anerkannten Inhibitoren der Δ6 Desaturase, vollständig vom Isomer C18 :2 c9t13 getrennt werden, was zu tieferen Gehalten führt als in der Literatur. Die Analyse von Sommer- und Winterbutter aus der Schweiz hat vergleichbare Resultate wie in anderen europäischen Ländern gegeben.

Summary «Analysis of the Fatty Acid Composition of the Milk Fat. I. Optimisation and Validation of a General Method Adapted to the Research»

A method for the determination of the fatty acid composition (70 fatty acids) of milk fat by gas chromatography on a capillary column *CP-Sil 88,* 100 m with *«on column»* injection mode was optimised and validated according to norm *ISO* 17025.

The injection mode was chosen in place of the *«split»* mode because of the lower risk of discrimination between very different volatile fatty acids which are a characteristic of milk fat. The peaks were identified based on reference substances and published identifications under consideration of known types and concentrations of fatty acids of milk fat. The fatty acids C14 to C17 were eluted in the following order; *saturated, iso, mono-unsaturated trans, anteiso and mono-unsaturated cis.* Their concentrations corresponded to known values except for several iso and aiso fatty acids which were well separated and identified under our conditions but whose concentrations were sometimes distinctly different from those found in the literature. Also, the isomer C18 :2 t9t12, a well known inhibitor of Δ6 desaturase, was well separated from the isomer c9t13 C18 :2 and their concentrations in milk fat were below those previously published. Comparison between Swiss summer and winter butter yielded results similar to those of other European countries.

Key words
FAME, Milk fat, Analysis, CLA, TFA, Capillary gas chromatography

Bibliographie

1 *Watkins, S.M., Carter, L.C., Mak, J., Tsau, J., Yamamoto, S.* and *German, J.B.:* Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumor cells. J. Dairy Res. **66**, 559–567 (1999).
2 *Parodi, P.W.:* Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. J. Dairy Sci. **82**, 1339–1349 (1999).
3 *Divers auteurs:* Séminaire «Les acides gras et leurs impacts métaboliques et physiologiques», INRA, Jouy-en-Josas (F), 23–24 juin 1998.
4 *Simopoulos, A.P.:* Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **60**, 421–429 (1999).
5 *Sieber, R.:* Konjugierte Linolsäuren in Lebensmitteln: eine Übersicht. Ernährung **6**, 265–270 (1995).
6 *Fritsche, J.* and *Steinhart, H.:* Analysis, occurrence and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA)- a review. Fett/Lipid **100**, 190–210 (1998).
7 *Ha, Y.L.; Grimm, N.K.* and *Pariza, M.W.:* Anticarcinogens from fried ground beef. Heat altered derivaties of linoleic acid. Carcinogenesis **8**, 1881–1887 (1987).
8 *Cawood, P., Wickens, D.G., Iversen, S.A., Braganza, J.M.* and *Dormandy, T.C.:* The nature of diene conjugation in human serum, bile and duodenal juice. Fed. Eur. Biol. Soc. **59**, 280–283 (1983).
9 *Gurr, I.G.:* Isomeric fatty acids. Biochem. Soc. Trans **15**, 336–338 (1987).
10 *Fritsche, J., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Sehat, N., Ku, Y.* and *Steinhart, H.:* Conjugated linoleic acid (CLA) isomers in human adipose tissue. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **205**, 415–418 (1997).
11 *Sehat, N., Kramer, K.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Morehouse, K.M.* and *Ku, Y.:* Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gaschromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. Lipids **33**, 963–971 (1998).
12 *Pariza, M.:* Conjugated linoleic acid, a newly recognised nutrient. Chem. Ind. (London) **12**, 112–118 (1997).

13 *Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J.* and *Tove, S.B.:* Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by Butyrivibrio fibrisolvens. J. Biol. Chem. **241**, 1350–1354 (1966).
14 *Watts, G.F., Jackson, P., Burke, V.,* and *Lewis, B.:* Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. Am. J. Clin. Nutr. **64**, 202–209 (1996).
15 *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).
16 *Emken, E.A.:* Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. Ann. Rev. Nutr. **4**, 339–376 (1984).
17 *Chern, J.* and *Kinsella, J.E.:* The effects of unsaturated fatty acids on the synthesis of arachidonic acid in rat kidney cells. Biochim. Biophys. Acta **750**, 465–471 (1983).
18 *Kinsella, J.E., Hwang, D.H., Yu, P., Mai, J.* and *Shimp, J.:* Prostaglandins and their precursors in tissues from rats fed on trans, trans-linoleate. Biochem. J. **184**, 701–704 (1979).
19 *Ratnayake, W.M.N.* and *Pelletier, G.:* Positional and geometrical isomers of linoleic acid in partially hydrogenated oils. JAOCS **69**, 95–105 (1992).
20 *Precht, D.* and *Molkentin, J.:* Trans geometrical and positional isomers of linoleic acid including conjugated linoleic acids (CLA) in German milk and vegetable fats. Fett/Lipid **99**, 319–326 (1997).
21 *Kris-Etherton, P.M.:* Report of the expert panel on trans fatty acids and coronary heart diseases. Am. J. Clin. Nutr. **62**, 655S–707S (1995).
22 *Aro, A., Antoine, J.M., Pizzoferrato, L., Reykdal, O.* and *van Poppel, G.:* Trans fatty acids in dairy and meat products from 14 European countries: The TRANSFAIR study. J. of Food Composition and Analysis **11**, 150–160 (1998).
23 *Anonyme:* Ernährungswoche des internationalen Milchverbandes, San Francisco, 4–6 octobre 1999. Schnell-Informationen VDM (Verband der deutschen Milchwirtschaft, Meckenheimer Allee 137, 53115 Bonn), S. 6–7, Januar 2000.
24 *Standard ISO Draft 15885:* Milkfat. Determination of the fatty acid composition by gas liquid chromatography (1997).
25 *Standard ISO Draft 15884:* Milkfat. Preparation of fatty acid methyl esters (1997).
26 *Molkentin, J.* and *Precht, D.:* Optimized analysis of trans-octadecenoic acids in edible fats. Chromatographia **41**, 267–272 (1995).
27 *Wolff, R.L., Combe, N.A., Precht, D., Molkentin, J.* and *Ratnayake, W.M.N.:* Accurate determination of trans C18 :1 isomers by capillary gas-liquid chromatography on cyanoalkyl polysiloxane stationary phases. OCL-Oléagineux, Corps Gras, Lipides **5**, 295–300 (1998).
28 *Wolff, R.L., Bayard, C.C.* and *Fabien, R.J.:* Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18 :1 acids. Application to the study of seasonal variations in French butters. JAOCS **72**, 1471–1483 (1995).
29 *Ramamurthi, S, Manohar, V.* and *Mani, V.V.S.:* Characterization of fatty acid isomers in dehydrated castor oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry techniques. JAOCS **75**, 1297–1303 (1998).
30 *Fritsche, J.* and *Steinhart, H.:* Contents of trans fatty acids (TFA) in German foods and estimation of daily intake. Fett/Lipid **99**, 314–318 (1997).
31 *Standard IUPAC 2.208.* International Union of Pure and Applied Chemistry, Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives 7th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, 1987.
32 *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).
33 *Grob, K.:* Chromatographic methods. Classical split and splitless injection in capillary GC 2. Ed. Dr A. Huethig Verlag, Heidelberg, Basel, New York 1988.

34 *Precht, D.* and *Molkentin, J.:* Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. Intern. Dairy J. **6**, 791–809 (1996).
35 *Precht, D.* und *Molkentin, J.:* Vergleich der Fettsäuren und der Isomerenverteilung der trans-C18 :1-Fettsäuren von Milchfett, Margarine, Back-, Brat- und Diätfetten. Kieler Milchwirt. Forschungsber. **49**, 17–34 (1997).
36 *Ulberth, F.* and *Henninger, M.:* Simplified method for the determination of trans monoenes in edible fats by TLC-GC. JAOCS **69**, 829–831 (1992).
37 *Ulberth, F.* and *Henninger, M.:* Quantitation of trans fatty acids in milk fat using spectroscopic and chromatographic methods. J. Dairy Research **61**, 517–527 (1994).
38 *Adlof, R.* and *Lamm, T.:* Fractionation of cis and trans oleic, linoleic and conjgated linoleic fatty acid methyl esters by silver ion high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A **799**, 329–332 (1998).
39 *Lavillonnière, F., Martin, J.C., Bougnoux, P.* and *Sébédio, J.L.:* Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. JAOCS **75**, 343–352 (1998).
40 *Rickert, R., Steinhart, H., Fritsche, J., Sehat, N., Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Yuoh Ku* and *Kramer, J.K.G.:* Enhanced resolution of conjugated linoleic acid isomers by tandem-column silver-ion high performance liquid chromatography. J. High Resol. Chromatogr. **22**, 144–148 (1999).
41 *Precht, D., Molkentin, J.* and *Vahlendieck, M.:* Influence of the heating temperature on the fat composition of milk fat with emphasis on cis-/trans-isomerization. Nahrung **43**, 25–33 (1999).
42 *Wolff, R.L.:* Contribution of trans-18 :1 acids from dairy fat to European diets. JAOCS **71**, 277–283 (1994).
43 *FIL/IDF:* Milk and Milkproducts. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. (Joint IDF/ISO Standard), provisional norm **172**, 1995.

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