www.demptos.fr
LA BIBLIOTHEQUE R&D DEMPTOS
Publications scientifiques et techniques

SCIENCES DES ALIMENTS, 15(1995) 49-58

Sur l'identification par spectrométrie de masse des produits formés par autoxydation de l'acide linoléique en milieu hydroalcoolique

Nicolas VIVAS [1*], Guy BOURGEOIS [2], Yves GLORIES [3], Christiane VITRY [2]

SUMMARY Identification by mass spectrometry of the linoleic acid autoxidation products in hydroalcoholic solutions

The unsaturated fatty acids and the complex lipids containing unsaturated fatty acids, are very oxygen sensitive. These molecules are found in numerous alcoholic beverages and their autoxidation leads to the formation of hydroperoxides, themselves transformed into volatile compounds with a bad smell, thus centributing to the off flavour of hydroalcoholic beverages. The present study involves hydroperoxide formation from linoleic acid in hydroalcoholic media of wine like composition (12% vol. asthanol, pH = 3.5), containing traces of iron and copper as oxidation promotors. First, a method to stabilize the hydroperoxide structure is proposed, consisting in reducing the OOH function to more stable alcohol function, followed by a methylation of the carboxylic function to the corresponding methyl ester. These derivatized molecules are more stable and more volatile than the initial hydroperoxides. By high performance liquid chromatography coupled with liquid secondary ion mass spectrometry, four derivatives of molecular weight 310 are observed ; they correspond to the four expected reduced and methylated hydroperoxides.

Key-words : *linoleic acid, mass spectrometry, autoxidation, hydroperoxide.*

RÉSUMÉ

Les acides gras insaturés et les lipides complexes contenant des chaînes d'acides gras insaturés sont sensibles à l'oxydation. Ces molécules se retrouvent dans de nombreuses boissons et leur autoxydation conduit à la formation d'hydroperoxydes, dégradés à leur tour en molécules volatiles généralement malodorantes. Elles peuvent donc constituer une source potentielle d'altération de l'odeur. Nos travaux ont plus particulièrement porté sur la formation d'hydroperoxydes d'acide linoléique, choisi comme substrat, en milieu hydroalcoolique de composition proche des vins (12 % vol. d'éthanol et pH = 3,5) et en présence de catalyseurs (traces de cuivre et de fer). Nous proposons, dans un premier temps, une méthode de stabilisation des structures

1. Tonnellerie DEMPTOS S.A, détaché à l'institut d'œnologie, Université de Bordeaux II.
2. Centre d'étude structurale et d'analyse des molécules organiques (CESAMO) URA CNRS N° 35, Université de Bordeaux-1, 351 cours de la Libération, F-33405 Talence.
3. Laboratoire de chimie appliquée, Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II, 351 cours de la Libération, 33405 Talence (France).
* Correspondance et demande de tirés à part.

hydroperoxydiques consistant en une réduction de la fonction OOH en fonction alcool, puis en une méthylation de la fonction carboxylique en ester méthylique correspondant, ceci conférant à la molécule une plus grande volatilité et une stabilité accrue. Ce protocole a permis de détecter par couplage chromatographie liquide haute performance/spectrométrie de masse quatre produits de masses moléculaires 310, correspondant aux quatre hydroperoxydes attendus, sous formes réduites et méthylées. Le recours à la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse en ionisation chimique, a permis de confirmer l'existence de ces quatre hydroperoxydes.

Mots clés : *acide linoléique, spectrométrie de masse, autoxydation, hydroperoxyde.*

1 - INTRODUCTION

Les composés lipidiques sont des substances particulièrement instables. L'autoxydation des lipides a été décrite pour la première fois en 1954 par MATSUO, puis confirmée par KANETA *et al.* en 1955. Il s'agit d'une réaction entre l'oxygène moléculaire et la double liaison insaturée d'un acide gras, conduisant à un hydroperoxyde. Les travaux de FRANKEL *et al.* (1961) ont permis de déterminer la structure commune de ces peroxydes, en prenant comme modèle réactionnel un milieu tamponné et comme substrat l'acide linolénique (C18 : 3 Δ9 Δ12 Δ15). La structure générale de ces molécules a été établie et correspond à "R(OOH)n" ; elle suggère l'existence de monohydroperoxydes et de polyhydroperoxydes. Les hydroperoxydes ont la propriété d'oxyder d'autres molécules plus fragiles et possèdent des effets toxiques à l'égard de l'organisme (KOSKAS, 1985 ; PORTER *et al.*, 1979). L'oxydation des acides gras polyinsaturés provoque également une dépréciation de la qualité des denrées alimentaires ; c'est pourquoi les hydroperoxydes ont été étudiés dans les huiles (YANG *et al.*, 1991) et dans les colorants naturels (ABBAS *et al.*, 1988). Les acides gras insaturés, généralement présents à l'état de traces dans de nombreuses boissons fermentées, et en particulier dans le vin (FISENKO et KOSSOVA, 1973 ; BERTRAND et SOUFLEROS, 1989), subissent une oxydation catalytique favorisée par la présence de métaux de transition (Cu, Fe,... ; VIVAS, 1993). Les produits formés se dégradent rapidement, sous l'effet des mêmes catalyseurs, en molécules de faible poids moléculaire (FRANKEL, 1980, 1982) ; certaines d'entre-elles, fortement odorantes, sont susceptibles d'altérer l'arôme des boissons (FORSS, 1972).

Nous nous proposons, dans ce travail, de mettre en évidence l'existence d'hydroperoxydes d'acides gras insaturés, formés en milieu hydroalcoolique, de composition proche de celle du vin, d'une part par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse (CPG/SM) en ionisation chimique, d'autre part par couplage de la chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) avec la spectrométrie de masse en mode "LSIMS" (liquid secondary ion mass spectrometry, ABERTH *et al.*, 1982).

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Conditions d'oxydation

Les oxydations sont conduites en milieu hydroalcoolique de composition suivante : 120 ml d'éthanol (95 % v:v), 5 g d'acide tartrique (Rectapur™), eau Ultrapur™ qsp 1 000 ml, NaOH N qsp pH = 3,5. Les milieux hydroalcooliques sont supplémentés par 3,56 10^{-4} mol. l^{-1} d'acide linoléique (Merck) [C18 : 2 Δ9 Δ12]. L'oxydation est réalisée à la température ambiante et à l'obscurité par barbotage d'air reconstitué jusqu'à saturation (7 mg d'oxygène/l à 20 °C), dans 100 ml du milieu contenant l'acide linoléique.

2.2 Mise en évidence et estimation de la teneur en hydroperoxydes

L'autoxydation des acides gras insaturés conduit à la formation d'hydroperoxydes caractérisés par la présence de diènes conjugués dans la chaîne aliphatique, dont le maximum d'absorbance UV se situe à 234 nm (LEA, 1956 ; CILLARD, 1978). Ainsi, la variation de la densité optique (DO) à 234 nm au cours de l'oxydation d'un milieu est parfaitement corrélée avec l'apparition et l'accumulation des hydroperoxydes (MAZEAUD et MICHELSON, 1980). La concentration en hydroperoxydes est alors estimée à partir du coefficient d'extinction moléculaire à 234 nm d'un mélange témoin d'hydroperoxydes d'acide linoléique (ε_{234} = 2,6 x 10^4). Le ε_{234} calculé correspond à celui établi par JOHNSTON *et al.* (1961). Les résultats sont exprimé en mg/l d'équivalent hydroperoxydes d'acide linoléique.

2.3 Localisation de l'activité peroxydative

La méthode, mise au point dans notre laboratoire pour vérifier que l'essentiel des hydroperoxydes sont extraits, est basée sur la décoloration d'une solution de bleu de méthylène (BMH_2).

A 1 ml de BMH_2 (solution à 5 mg/l) on ajoute 100 µl du milieu contenant des hydroperoxydes. On mesure la densité optique à 660 nm, d'abord au départ de la réaction, après homogénéisation (DO1), puis après 10 min (DO2). Les résultats sont exprimés à partir de la relation suivante :

$$A_p = 100\ (DO1 - DO2).$$

2.4 Extraction et caractérisation des hydroperoxydes

2.4.1 Extraction liquide/liquide des hydroperoxydes

Cent millilitres de milieu contenant des hydroperoxydes sont extraits par 3 x 10 ml de chloroforme. La phase organique est décantée, puis séchée sur du sulfate de sodium anhydre. Le solvant est ensuite évaporé sous courant d'azote sec.

2.4.2 Techniques d'identification des hydroperoxydes

2.4.2.1 Dérivation des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes ne peuvent être étudiés à l'état natif, en raison de leur grande réactivité et de leur thermolabilité. Après extraction, il convient donc de les transformer en produits plus stables, en suivant les étapes suivantes : réduction de la fonction hydroperoxyde en alcool au borohydrure de sodium (NaBH4), puis méthylation de la fonction acide par le méthanol en présence de diazométhane (CH_2N_2).

Pour la réduction des hydroperoxydes, l'extrait chloroformique, évaporé à sec sous courant d'azote, est repris par 1 ml de méthanol anhydre à 20 °C et soniqué pendant 10 s. Pour ralentir l'intensité de la réduction et préserver les caractéristiques structurales des molécules, l'extrait est dilué dans 50 ml de méthanol anhydre refroidi à – 30°C, puis additionné de 216 mg de $NaBH_4$. Après 30 min., on ajoute 50 ml d'eau pour détruire l'excès de $NaBH_4$. On extrait par trois fois 10 ml d'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre, puis évaporées sous courant d'azote. Le résidu est repris par 1 ml de méthanol anhydre.

La méthylation des hydroxyperoxydes réduits permet d'augmenter la volatilité des molécules possédant des fonctions acides (FALES *et al.*, 1973).

L'extrait méthanolique issu de la réduction des hydroperoxydes est placé dans le tube récepteur d'un micro-générateur de diazométhane constitué de deux tubes concentriques (Alltech, Ref 9559, millimole size). On mélange 10 mg de N-méthyl-N-nitro-p-toluènesulfonamide (Aldrich Chimie, DiazaldTM) et 1 ml de soude méthanolique 5N. On laisse les réactifs en contact pendant une heure environ, à 20 °C, avant de les analyser directement par CLHP/LSIMS et par CPG/SM.

2.4.2.2 Identification par couplage CLHP/LSIMS

Le chromatographe est un WATERS 600MS équipé d'une colonne C18 sphérisorb ODS (15 x 4,6 cm ; dp : 4 µm). L'élution est réalisée avec une solution hydroalcoolique à 50 % vol., contenant 2 % de glycérol (Matrice), avec un débit de 0,5 ml min^{-1}. Le chromatogramme est enregistré à 234 nm. Le volume d'injection est de 10 µl.

Le couplage du spectromètre de masse (VG AutoSpec-EQ) au chromatographe est assuré par un tube capillaire de 50 µm de diamètre intérieur et 1 m de longueur, connecté à la sortie du détecteur UV par l'intermédiaire d'un diviseur. La source d'ions primaires est un canon au césium dont l'énergie est réglée à 35kV (2 µA). La cible est située à l'extrémité du capillaire de liaison ; à sa surface arrivent les analytes au fur et à mesure de leur élution ; elle est maintenue à une température inférieure à 40 °C pour éviter la disparition trop rapide de la matrice. L'étalonnage du spectromètre est réalisé avec de l'iodure de césium (de 200 à 1 500 daltons). L'acquisition et le traitement des spectres sont faits à l'aide du système OPUS intégré à l'appareil (VAXstation 3 100 Digital Equipments).

2.4.2.3 Identification par couplage CPG/SM :

Le chromatographe Hewlett-Packard type 5890, équipé d'un injecteur-diviseur et d'une colonne capillaire en silice fondue CPSIL-5CBTM (25 m de long. – 0,25 mm de diamètre interne), est couplé au spectromètre de masse AutoSpec-EQ. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : volume injecté, 2 µl – rapport de division 1/50 – température de l'injecteur, 180 °C – température de colonne programmée de 100 °C à 300 °C à raison de 6 °C/min – température de l'interface CPG/SM, 180 °C. Le gaz vecteur est de l'hélium, dont la pression est maintenue constante à 1 bar.

Les spectres de masse sont enregistrés en ionisation chimique (IC), le gaz réactif étant l'ammoniac. La source du spectromètre de masse est maintenue à 180 °C. La gamme de masses balayée est de 50 à 650 daltons en une seconde. L'acquisition et le traitement des données sont effectués également à l'aide du système OPUS.

3 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Mise en évidence d'hydroperoxydes formés par autoxydation de l'acide linoléique

Cent millilitres d'émulsion aqueuse contenant $3{,}56.10^{-4}$ mol. l^{-1} d'acide linoléique sont oxydés pendant 72 h dans les conditions précédemment décrites. On observe une augmentation de l'absorbance à 234 nm, ce qui met bien en évidence la formation d'hydroperoxydes à partir de l'acide gras insaturé. Les hydroperoxydes produits présentent une affinité particulière à l'égard du chloroforme. l'extrait chloroformique contient l'essentiel de l'activité peroxydative (AP) (Ap de l'émulsion hydroalcoolique = 52 ; Ap de l'extrait chloroformique = 58 ; Ap du résidu d'extraction = 7).

Dans une autre expérience, on mesure au cours du temps la cinétique de formation des hydroperoxydes par spectrophotométrie à 234 nm. En milieu hydroalcoolique modèle, la production d'hydroperoxyde est rapide *(fig. 1)*. Les hydroperoxydes atteignent au bout de 4 h une concentration maximale de 16 mg/l, qui diminue ensuite très lentement ; dix jours après, il en reste encore 5 mg/l. Parallèlement à l'augmentation de la densité optique à 234 nm, on observe une forte augmentation du pouvoir peroxydatif du milieu, mesuré par la méthode au bleu de methylène.

3.2 Identification des hydroperoxydes formés

Le couplage CLHP/LSIMS permet de repérer un ion à m/z = 315, dont la trace enregistrée (fragmentogramme), fait apparaître quatre pics. Parallèlement, on observe quatre pics homologues détectés à 234 nm. Ce résultat montre qu'il existe quatre hydroperoxydes dans le mélange initial provenant de l'autoxydation de l'acide linoléique.

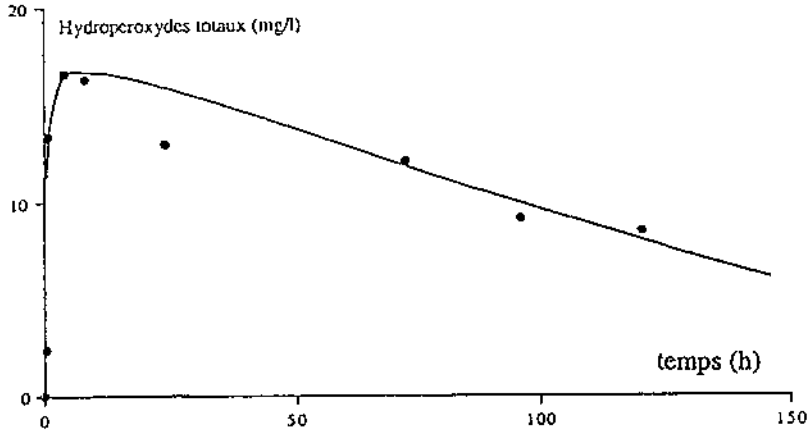

Figure 1

Production d'hydroperoxydes à partir de l'acide linoléique, en milieu hydroalcoolique.

Production of hydroperoxides from linoleic acid, in hydroalcoholic medium.

La molécule protonée observée en LSIMS, apparaît à m/z 315 et non pas à m/z 311, comme on pourrait s'y attendre. L'ion obtenu, $(M+5H)^+$ au lieu de $(M+H)^+$ pour la molécule protonée normalement attendue, n'est pas le produit direct de la dérivation des hydroperoxydes, mais le résultat d'une réduction qui se produit à l'intérieur de la source. Il semble qu'au niveau de la cible, la matrice glycérol cède, en même temps qu'un proton, plusieurs atomes d'hydrogène à ces molécules insaturées, provoquant ainsi la réduction des doubles liaisons conjuguées de la chaîne aliphatique. Des phénomènes analogues ont déjà été signalés à plusieurs reprises et notamment par VEKEY et ZERELLI (1991) dans le cas de composés facilement réductibles comme les quinones. Il semblerait que les alcools α-diéniques soient particulièrement réductibles et conduisent à un résultat analogue à celui signalé par ces auteurs.

Pour montrer que ces molécules protonées et réduites, observées en LSIMS, ne proviennent pas du 13-hydroxy-stéarate de méthyle susceptible de préexister dans le mélange, nous avons effectué une expérience complémentaire, dans les mêmes conditions, avec ce composé, que nous avons synthétisé au laboratoire selon le protocole décrit par KOSKAS (1985). On obtient bien, comme prévu, un pic à m/z 315, mais à un temps de rétention différent de celui des quatre pics issus des hydroperoxydes. De plus, la trace UV à 234 nm est d'une intensité beaucoup plus faible. Les quatre pics observés simultanément sur les chromatogramme de masse et détectés en UV sont donc bien des dérivés des hydroperoxydes.

Afin de confirmer cette identification, nous avons effectué une analyse par couplage CPG/SM en ionisation chimique sur les dérivés réduits-méthylés des hydroperoxydes. Nous observons *(fig. 2)* la présence de l'acide linoléique résiduel, caractérisé par l'ion "quasimoléculaire" (MNH_4^+) à m/z = 312. Les

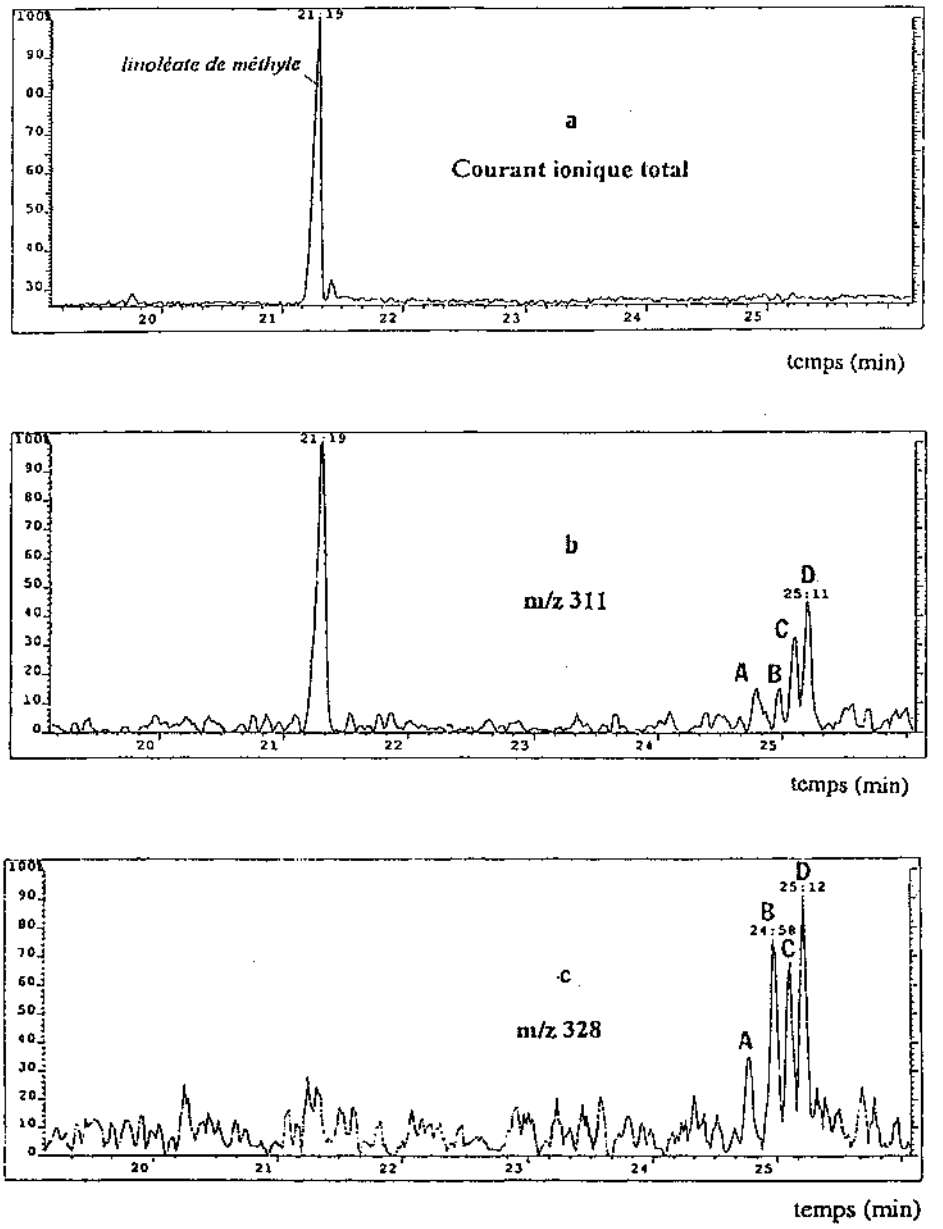

Figure 2

Détection (CPG/SM, IC NH_3) de l'acide linoléique et de ses produits d'autoxydation dérivés (A, B, C, D) - 4a, courant ionique total - 4b, fragmentogramme m/z 311 - 4c, fragmentogramme m/z 328.

Detection (GC/MS, CI NH_3) of linoleic acid and its autoxidation derivatives (A, B, C, D) - 4a, total ion current - 4b, m/z 311 fragmentogram - 4c, m/z 328 fragmentogram.

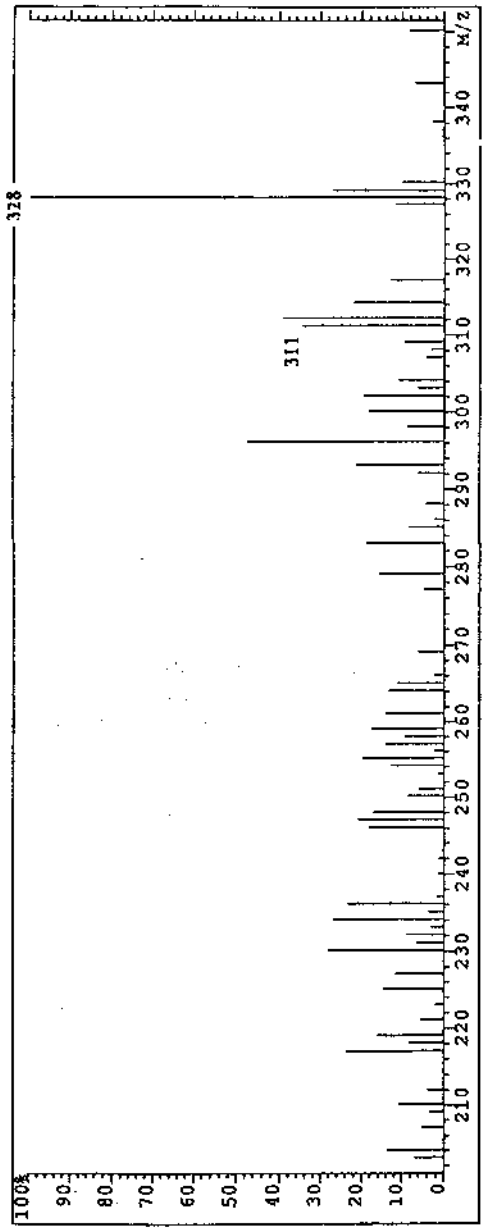

Figure 3

Spectre de masse (IC NH3) du composé D, dérivé de l'un des hydroperoxydes d'acide linoléique.

Mass spectrum (CI NH3) of D compound, derived from one of the linoleic acid hydroperoxides.

dérivés des hydroperoxydes recherchés sont très peu concentrés dans le mélange et n'apparaissent que très faiblement sur la trace du courant ionique total, étant masqués partiellement par le bruit de fond. Ils sont détectés néanmoins grâce à l'enregistrement de leurs ions "quasimoléculaires" : MNH_4^+ (m/z = 328) et MH^+ (m/z = 311). Nous retrouvons bien, sur la figure 2, les quatre isomères attendus, dont la présence avait été détectée en LSIMS. Les spectres de masse obtenus au sommet de ces quatre pics sont pratiquement identiques ; on y observe la présence des deux ions quasimoléculaires précédents, avec une forte prédominance de MNH_4^+ (*fig. 3).* Ceci est en accord avec la relative acidité de ces molécules, sur lesquelles se fixe plus facilement un ion ammonium qu'un proton.

La présence de quatre isomères s'explique si l'on considère que deux sites d'autoxydation sont possibles (en C9 et C13 de la chaîne aliphatique) et que chacune de ces deux molécules possède deux formes isomériques, *cis* et *trans*.

4 - CONCLUSION

Les acides gras insaturés et en particulier l'acide linoléique (C18 : 2), sont susceptibles de s'oxyder en hydroperoxydes. En solution hydroalcoolique, la composition du milieu, et en particulier le pH et la présence d'éthanol, ne constituent pas un obstacle à leur formation,.

La séparation des produits de l'autoxydation de l'acide linoléique par CLHP permet d'isoler quatre hydroperoxydes, dont l'étude par spectrophotométrie dans l'ultraviolet, puis par couplage CLHP/LSIMS et CPG/MS, conduit à l'identification de quatre composés hydroperoxy-octadécadiènoïques.

5 - REMERCIEMENTS

Ce travail a été conduit grâce à l'appui financier du Conseil Régional d'Aquitaine.

Manuscrit reçu le 5 avril 1994, accepté le 11 octobre 1994.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBAS J., ROUET-MAYER M.O., TREMOLIERES A., PHILIPPON J., 1988. Décoloration de la chlorophylle A par la lipoxygénase 1 de soja. Effets de différentes conditions d'oxygénation. *Sci. Aliments.*, **8**, 83-96.

ABERTH W., STRAUB K.M., BURLINGAME A.L., 1982. Secondary Ion Mass Spectrometry with Cesium Ion Primary Beam and Liquid Target Matrix for Analysis of Bioorganic Compounds. *Anal. Chem.*, **54**, 2029-2034.

BERTRAND A., SOUFLEROS E., 1989. Dosage des acides gras libres et totaux du vin. *Sci. Aliments.*, **9**, 169-177.

CILLARD J., 1978. Etude de l'effet prooxygène de l'α-tocophérol en milieu aqueux. *Thèse doctorat d'état ès sciences pharmaceutiques. Université de Rennes.*

FALES H.M., JAOUNI T.M., BABASHAK J.F.,1973, Simple Device for Preparing Ethereal Diazomethane without Resorting to Codistillation, *Anal. Chem.*, **45**, 2302-2303.

FISENKO V.U., KOSSOVA G.V., 1973. Sur les produits d'oxydation des lipides dans les vins. *Izv. Vyssch. Outcheb. Zav Pichtev. Technol. SSSR*, **4**, 164-166.

FORSS D.A., 1972. Odor and flavor compounds from lipids. *Proceedings of Chemistry of Fats and other lipids.*, **13**, 177-258.

FRANKEL E.N., 1980. Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.*, **19**, 1-22.

FRANKEL E.N., 1982. Volatile lipid oxidation product. *Prog. Lipid Res.*, **22**, 1-33.

FRANKEL E.N., EVANS C.D., Mc CONNELL D.G., SELKE E., DUTTON H.J., 1961. Autoxidation of methyl linoleate. Isolation and characterization of hydroperoxides. *J. Organic Chem.*, **26**, 4663-4669.

JOHNSTON A.E., ZILCH K.T., SELKE E., DUTTON H.J., 1961. Analysis of fatty acid oxidation by counter current distribution method. 5 : Low temperature decomposition of methyl linoleate hydroperoxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 367-371.

KANETA T., SAKAI H., ISHII S., 1955. (japonais) Valeur nutritive ou toxicité des acides gras hautement insaturés. *J. Biochem., Tokyo.*, **42**, 561-573.

KOSKAS J.P., 1985. Effets des tocophérols sur la formation des hydroperoxydes de l'acide linoléique. Interaction des produits d'oxydation. 2 Tomes. *Thèse doctorat d'état ès sciences pharmaceutiques. Université de Rennes.*

LEA C.H., 1956. in G. POPJAK & E. LEBRETON (ed.), *Biochemical problems of lipids*, Butterworths, London.

MATSUO N., 1954. (japonais) Toxicité des huiles de poissons. *J. Biochem., Tokyo.*, **41**, 481-487.

MAZEAUD F., MICHELSON A.M., 1980. Inhibition de l'autoxydation des acides gras polyinsaturés par la superoxyde dismutase. *Ann. Nutr. Alim.*, **34**, 351-364.

PORTER N.A., WOLF R.A., WEENEN H., 1979. The free radical oxidation of polyunsaturated lecithins. *Lipids*, **15**, 163-167.

VEKEY K., ZERELLI L.F., 1991, Chemical Reactions in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, **26**, 939-944.

VIVAS N., 1993. Recherches sur les composés intermédiaires de l'oxydation des vins : Les hydroperoxydes d'hydrogène et d'acides gras insaturés. *Memoire DEA, Université de Bordeaux II.*

YANG G.C., QIANG W., MORENHOUSSE K.M., ROSENTHAL I., KU Y., YURAWEC Z., 1991. Determination of hydroperoxydes in edible oils electron spin resonance, thiobarbituric acid assay and liquid chromatography-chemiluminescence techniques. *J. Agri. Food Chem.*, **39**, 896-898.