

Analyse des lipides polaires de la MFGM par SPE et HPLC-ELSD

Pascal Bodson¹, Sabine Danthine², Christophe Blecker³, Bernard Wathelet⁴, Georges Lognay⁵, Jean-Paul Wathelet⁶, Claude Deroanne⁷, Michel Paquot⁸

¹ Assistant, ² Assistante, ³ Chef de travaux, ⁷ Chef de Service, FUSAGx, Unité de Technologie des Industries Agro-Alimentaires, URL: <http://www.fsagx.ac.be/ta>

¹ Assistant, ⁴ Chargé de cours, ⁸ Chef de Service, FUSAGx, Unité de Chimie Biologique Industrielle, URL: <http://www.fsagx.ac.be/cb>

⁶ Chef de Service, Unité de Chimie Générale et Organique, URL: <http://www.fsagx.ac.be/cg>

⁵ Chef de Service, Unité de Chimie Analytique, URL: <http://www.fsagx.ac.be/ca>

Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux,

Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgique.

Contact e-mail : bodson.p@fsagx.ac.be

Cette recherche bénéficie du soutien financier de la Région Wallonne - Direction Générale de l'Agriculture (DGA)

Introduction

Le lait bovin contient environ 4% de matière grasse répartie dans la phase sérique sous forme de petits globules sphériques dont le diamètre varie entre 0.1 et 10 μm . L'émulsion huile dans eau que constitue le lait est stabilisée grâce à une fine membrane entourant le globule gras, appelée MFGM (milk fat globule membrane). La MFGM se compose d'un mélange complexe de protéines, principalement des enzymes, de glycoprotéines et de lipides (Danthine et al., 2000). Cette fraction lipidique comprend deux tiers de lipides neutres pour un tiers de lipides polaires (LPs) parmi lesquels les principaux sont des phospho- et des sphingolipides et les composés mineurs sont essentiellement des glycolipides. Avec leur structure amphiphile, ces lipides polaires présentent des propriétés émulsifiantes et stabilisantes importantes. L'analyse des lipides polaires constitue une étape préliminaire et nécessaire pour une meilleure compréhension des propriétés fondamentales de la MFGM. Cette présentation décrit une procédure spécifique à la détermination tant qualitative que quantitative des LPs contenus dans la MFGM.

Etude de la procédure d'analyse des lipides polaires de la MFGM

Au cours de cette recherche, quatre étapes majeures de l'analyse des LPs de la MFGM ont été étudiées : l'isolement de la MFGM, l'extraction des lipides totaux de cette matrice biologique, la purification de la fraction des LPs et l'analyse quantitative par HPLC-ELSD de cette fraction.

1- Isolement de la MFGM

Partant d'une même crème crue, non traitée thermiquement, une MFGM native est isolée après lavage de la crème par un tampon phosphate et déstabilisée par barattage. La composition en LPs de cette MFGM native est comparée à celle du babeurre extrait par barattage de cette crème mais non lavée par le tampon phosphate.

2- Extraction des lipides totaux

L'extraction des lipides totaux de la MFGM a suivi le protocole de Shaikh modifié par Rombaut et al. (2005). Il consiste à diluer 5g d'échantillon sec de MFGM dans 20 ml d'eau distillée et d'extraire les lipides avec un mélange CHCl_3 / CH_3OH en proportion variable au cours de 4 étapes successives. La phase CHCl_3 est récupérée et lavée par une solution saline.

3- Fractionnement des lipides totaux par SPE (solid phase extraction)

L'étape de purification des lipides polaires est généralement recommandée avant une injection en HPLC. Le fractionnement par SPE des lipides totaux en trois classes a été testé en suivant la méthode de Vaghela et Kilara (1995) modifiée par cette étude. Un échantillon de 80 mg de lipides totaux est déposé sur 0.5g de poudre d'aminopropyle et séché. La poudre est ensuite déposée au sommet d'une mini-colonne SPE de 2g d'aminopropyle conditionnée à l'hexane. Le fractionnement s'opère en trois phases selon le protocole d'élution de Vaghela, ce qui permet de séparer les lipides neutres, les acides gras libres et les lipides polaires.

4- Analyse des lipides polaires par HPLC-ELSD

Une nouvelle méthode d'analyse des lipides polaires développée par Rombaut et al. (2005) a été testée au cours de cette étude. Cette méthode HPLC utilise une colonne Prevail Silica 3 µm de 150 x 3.0 mm équilibré à 40°C et équipée d'une pré-colonne similaire. La phase d'élution suit un gradient linéaire d'un mélange CHCl₃ / CH₃OH / tampon acide formique – TEA à pH 3. La durée totale de l'analyse est de 25 minutes y compris la régénération. La détection des familles lipidiques est réalisée par ELSD. L'analyse des lipides polaires extraits par SPE a été comparée à celle des lipides totaux directement injectés sur colonne afin de déterminer l'utilité et l'efficacité de cette purification préalable.

Conclusions

Cette recherche visant à maîtriser une procédure performante d'analyse des lipides polaires de la MFGM a conduit aux conclusions suivantes :

- Une MFGM native peut être extraite à partir d'une crème crue et ainsi servir de modèle de référence pour des études fondamentales sur sa composition, sa structure et ses propriétés fonctionnelles. La composition en LPs de cette MFGM native est similaire à celle d'un babeurre frais.
- L'extraction des lipides totaux d'un babeurre frais est rendue plus délicate par la présence de composants résiduels comme les protéines sériques, les caséines et le lactose.
- Le fractionnement par SPE sur aminopropyle a révélé une rétention spécifique d'une partie des PI et des PS rendant cette étape inappropriée pour un dosage quantitatif des LPs de la MFGM. La technique reste cependant adaptée pour purifier les autres types de phospho- et sphingolipides.
- La méthode d'extraction et de dosage des LPs par HPLC-ELSD proposée par Rombaut présente de bonnes performances dans le cas de la matrice complexe que représente la MFGM et ne nécessite pas de purification préalable.

Ces résultats mettent en évidence toute l'importance des conditions d'extraction et de la maîtrise d'une méthode d'analyse efficace des lipides polaires en vue d'une étude plus fondamentale de la MFGM.

Références :

- Danthine S., Blecker C., Paquot M., Innocente N., Deroanne C., 2000. Evolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique. Lait, 80 - 209-222.
- Rombaut, R.; Camp, J.V.; Dewettinck, K., 2005. Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. Journal of Dairy Science, 88, 482-488.
- Vaghela M.N. and Kilara A., 1995. A rapid method for extraction of total lipids from whey protein concentrates and separation of lipid classes with solid phase extraction. JAOCS, 72 - 10, 1117-1121.