
Informations internes sur L'AGRICULTURE

**Recherche sur les additifs
pouvant être utilisés
comme révélateurs
pour la matière grasse butyrique**

PARTIE II

COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES

DIRECTION GÉNÉRALE DE L'AGRICULTURE

DIRECTION «ÉCONOMIE ET STRUCTURE AGRICOLES» – DIVISION «BILANS, ÉTUDES, INFORMATION»

*La reproduction, même partielle, du contenu de ce rapport est subordonnée
à la mention explicite de la source*

Informations internes sur L'AGRICULTURE

Recherche sur les additifs
pouvant être utilisés
comme révélateurs
pour la matière grasse butyrique

PARTIE II

COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES

DIRECTION GÉNÉRALE DE L'AGRICULTURE

DIRECTION « ÉCONOMIE ET STRUCTURE AGRICOLES » – DIVISION « BILANS, ÉTUDES, INFORMATION »

La présente étude a été entreprise dans le cadre du programme d'études de la Direction Générale de l'Agriculture des Communautés Européennes. Les travaux ont été réalisés par

la Station Laitière du Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat à Gembloux.

Les travaux ont été menés avec la participation des divisions "Bilans, Etudes, Information" et "Produits laitiers"

x

x x

Cette étude reflète uniquement l'opinion des auteurs responsables; elle ne peut être considérée comme reflétant nécessairement les conceptions de la Commission des Communautés Européennes. Elle ne préjuge en rien de l'attitude ni des décisions que la Commission pourrait être amenée à prendre dans ce domaine.

AVANT-PROPOS

Le présent rapport constitue la deuxième partie⁽¹⁾ de l'étude intitulée

"Recherche sur les additifs pouvant être utilisés comme révélateurs pour la matière grasse butyrique"

Si le premier volet de cette étude concerne principalement le "marquage" des beurres par des révélateurs connus et souvent utilisés, particulièrement au sein de la C.E.E., dans la deuxième partie, le problème posé par la recherche de traceurs efficaces pour la matière grasse butyrique est considéré dans son ensemble et l'accent est mis sur la recherche de révélateurs potentiels nouveaux. L'étude repose sur une littérature abondante et s'appuie sur de multiples tests et essais préliminaires dont les résultats confirment ou infirment la justesse du choix de nombreuses substances comme révélateurs éventuels de la matière grasse butyrique.

Nos remerciements s'adressent à Monsieur le Directeur Général F. LIEVENS de l'Administration de la Recherche Agronomique, qui a bien voulu nous autoriser à poursuivre cette étude dans le cadre des activités de la Personnalité Juridique de la Station Laitière de l'Etat de Gembloux.

Le Président de la P.J.

Gembloux, le 18 septembre 1972.

P. JAMOTTE.

(1) La première partie de cette étude est parue dans la Série "Informations internes sur l'Agriculture" N° 74, mai 1971.

SOMMAIRE

	<u>Page</u>
Introduction	1
Le "marquage" de la matière grasse butyrique à l'aide de traceurs	3
1. Les substances utilisées comme traceurs	5
1.1. Les révélateurs des margarines	5
1.2. Les traceurs utilisés pour la matière grasse butyrique	7
1.3. Les mélanges de matière grasse butyrique et de substances non grasses	10
1.4. Les arômes acides des "Ghee"	10
2. Les traceurs lipidiques	12
2.1. Les corps gras alimentaires comme traceurs des beurres	13
2.2. Les composés lipidiques commerciaux	26
2.3. Les additifs des corps gras	123
2.4. Les composés de l'insaponifiable des huiles raffinées	133
2.5. Les acides cyclopropéniques	138
2.6. Les acides conjugués et les acides trans	141
3. Les traceurs non lipidiques	142
3.1. Substances naturelles et substances non naturelles	142
3.2. Les indicateurs titrimétriques	143
3.3. Les dérivés des acides aminés	145
3.4. Les substances fluorescentes	145
4. Synthèse, perspectives générales en matière de choix de traceurs et conclusions générales	147
4.1. Synthèse	147
4.2. Perspectives générales en matière de choix de traceurs de la matière grasse butyrique	151
4.3. Conclusions générales	154

On trouvera à la fin du volume une table de matières détaillée.

INTRODUCTION

Cette étude a pour objet l'examen des possibilités d'ajouter un ou plusieurs traceurs dans des lots déterminés de graisse de beurre, afin de les "marquer" pour pouvoir en contrôler facilement la destination.

La graisse butyrique "marquée" doit pouvoir être utilisable sans restriction pour l'alimentation humaine; cette exigence implique que le traceur soit une substance assimilable, non toxique, n'affectant ni la nature, ni les propriétés de celle-ci. Les traceurs les plus efficaces et qui, à ce titre, ont reçu le plus d'attention, sont des substances qui "marquent" principalement la matière grasse.

Si, dans certains cas, comme celui du beurre, il existe des traceurs du non-gras, ceux-ci ne possèdent jamais toutes les propriétés requises pour permettre un "marquage" efficace. En effet, la séparation de la phase grasse et de la phase non grasse des produits à base de graisse butyrique, peut être réalisée industriellement à peu de frais. La phase grasse est alors de la graisse butyrique purifiée, non "marquée"; elle possède l'essentiel, voire la totalité de la valeur économique du produit de départ. La phase non grasse qui consiste généralement en eau, protéines, sucres ou produits divers est au contraire "marquée" par le traceur, mais elle ne possède plus généralement qu'un intérêt économique dérisoire, sinon nul.

Dans le texte de ce rapport, sauf indication précisée, on entendra par traceur du beurre, une substance "marquant" préférentiellement la matière grasse butyrique au non-gras.

Le "marquage" du beurre a été appliqué par la C.E.E. dans les dernières années, lorsque la production communautaire de graisse butyrique a laissé apparaître des excédents notoires. Le "marquage" est donc effectué sur des beurres ou sur des "butter oils" qui, en période de production excédentaire, ne peuvent plus être écoulés à prix normal. La graisse butyrique vendue à prix réduit est destinée à être utilisée dans des domaines où elle subit la concurrence d'autres graisses alimentaires; il ne doit pas être possible de la détourner de sa destination nouvelle pour la faire rentrer dans le commerce normal du beurre, ce qui consacrerait l'échec de l'opération de "marquage". La matière grasse butyrique "marquée" conservant intégralement la composition et les propriétés de la matière grasse butyrique pure, le "marquage" s'effectue par l'addition à cette dernière, de quantités aussi faibles que possible d'une ou de plusieurs substances, non toxiques, non économiquement éliminables, facilement déterminables et d'un prix de revient acceptable. Ces substances, appelées révélateurs ou traceurs, permettront d'identifier simplement une graisse butyrique "marquée" par rapport à une graisse butyrique normale.

Nous admettrons qu'un traceur analytique réellement efficace, doit permettre la mise en évidence de 5% de graisse butyrique "marquée" mélangée dans une graisse butyrique normale et nous tenons pour souhaitable qu'il autorise la détection de 2% de graisse butyrique "marquée" mélangée dans une graisse butyrique normale.

Dans cette étude, nous procéderons en premier lieu à un examen critique des substances ayant déjà été utilisées comme traceurs pour le beurre ou d'autres graisses alimentaires. Ensuite, nous tenterons de faire un tour d'horizon des possibilités actuelles en matière de choix de traceurs pour la graisse butyrique. Les substances apparaissant les plus aptes à être utilisées comme traceurs feront l'objet d'essais et de tests dont la description et les résultats sont rapportés.

Enfin, une synthèse des recherches et de leurs résultats sera présentée. Nous en déduirons des perspectives immédiates et futures en matière de choix de traceurs de la matière grasse butyrique et nous en tirerons les conclusions qui s'imposent.

Remarque

Il est évident que les problèmes posés par le "marquage" des beurres à l'aide de traceurs sont très vastes et très complexes et que les données disponibles sont en évolution continuelle. Cette évolution est liée en particulier, aux progrès enregistrés par l'industrie des corps gras dans le domaine de la synthèse et du raffinage, à la mise au point de nouveaux additifs, aux progrès des connaissances et de l'expérimentation biologiques et, en général, à l'évolution de multiples domaines scientifiques. L'inventaire de toutes les substances naturelles ou synthétiques, présentant certaines qualités d'un bon traceur de la graisse butyrique, ne saurait être complet.

Beaucoup de composés, dont la théorie prévoit qu'ils peuvent être facilement éliminés des corps gras dans l'industrie, n'ont pas été repris dans cette étude, même si souvent, des essais furent réalisés à titre de confirmation empirique.

Avant toute autre chose, ce rapport nullement exhaustif, reflète donc une situation actuelle, non figée. Si des perspectives, d'ailleurs fort lâches, sont suggérées en ce qui concerne un proche avenir, seules une analyse détaillée de la situation constatée au moment opportun, de concert avec une indispensable expérimentation préliminaire, pourront éventuellement établir leur justesse.

Le Chef de Travaux,
A. GUYOT

LE "MARQUAGE" DE LA MATIERE GRASSE BUTYRIQUE A L'AIDE DE TRACEURS

La recherche de traceurs efficaces de la matière grasse butyrique soulève de nombreux problèmes.

Ces problèmes sont de nature biologique, économique et analytique.

Le problème biologique est primordial, et c'est bien naturel, car il serait vain d'établir qu'une substance pourrait constituer un traceur extrêmement efficace sur le plan analytique, si son innocuité biologique n'était pas démontrée ou communément admise.

Le problème économique doit être considéré en deuxième lieu, car si un traceur biologiquement acceptable ne peut être obtenu qu'à des prix rendant le "marquage" non économique, ou si l'industrie n'est pas disposée à en assurer une production suffisante, son utilisation sera nécessairement rejetée.

Toutefois, le problème économique est extrêmement complexe; en effet, le prix de revient est lié non seulement à la complexité de la fabrication mais encore, pour une bonne part, au volume de la demande, ce dernier facteur devant être extrêmement variable.

Le problème analytique est celui dont apparemment l'étude est la plus simple. Cependant, des questions économiques lui sont indissolublement liées.

L'analyse ne peut être trop compliquée, trop lente ou trop coûteuse. A cet égard, un bon traceur doit être non seulement facilement et rapidement décelable, mais il ne peut être extrait des corps gras par des techniques économiques, sans altération compromettant la valeur alimentaire et la valeur marchande de ceux-ci. Analytiquement, cette dernière condition est apparue comme la plus malaisée à obtenir pour la plupart des traceurs dont l'utilisation a été permise jusqu'à présent. Cependant, si on envisage le choix de nouveaux traceurs, il est évident qu'il faut s'enquérir en premier lieu de leur innocuité et de leur disponibilité commerciale à un prix rendant le "marquage" économiquement possible.

Tout compte fait, le traceur peut être considéré comme un additif, et pour que le choix comme traceur d'une substance éventuelle ne suscite pas de réticences au sujet de son innocuité biologique, il sera nécessairement effectué, soit au sein de produits alimentaires naturels, soit parmi les additifs autorisés par les législations sur les denrées alimentaires.

Il est entendu qu'un produit existant dans un aliment naturel peut être produit par synthèse, mais on prendra également garde de généraliser l'assertion erronée suivant laquelle un produit naturel n'est pas dangereux biologiquement et inversement qu'un produit synthétique est nécessairement nocif.

Les nécessités requises biologiquement et économiquement sont des axiomes qu'on ne peut ignorer. Elles limitent naturellement le choix des traceurs possibles à un champ fort restreint. A l'intérieur de celui-ci, ce sont des considérations analytiques qui guideront ce choix.

Comme il a été dit plus haut, le problème analytique est peut être moins le choix d'une substance facilement décelable que le choix d'une substance non économiquement éliminable des corps gras.

Une des qualités essentielles d'un bon traceur est d'être liposoluble, ce qui va généralement de pair avec un caractère hydrophobe.

En effet, plus le traceur choisi sera soluble dans les graisses, mieux sera-t-il réparti dans celles-ci, et plus difficilement pourra-t-il être extrait en milieu aqueux. L'eau constitue en effet le solvant industriel le moins cher et le plus universellement employé. Il est évident qu'aucune substance soluble dans l'eau ne constituera jamais un bon traceur d'une matière grasse. L'eau voit son pouvoir de dissociation augmenter vis à vis de certaines substances si on l'acidifie ou si on l'alcalinise. Aussi, parvient-on à éliminer des corps gras par simple lavage avec des solutions acides ou basiques diluées, de nombreux composés ayant tendance à former des électrolytes. C'est ainsi que le sésamol et la vanilline peuvent être extraits des beurres par lavages en milieu alcalin et l'éthoxyquine par lavages en milieu acide.

De manière générale, ni les composés acides, ni les composés basiques ne constitueront donc d'excellents traceurs.

De toutes ces considérations, il résulte que le choix de traceurs convenables va se limiter à des substances plus ou moins neutres, liposolubles, et afin d'éviter toute réticence d'ordre biologique, ces substances devront être présentes dans certains produits alimentaires usuels, généralement des corps gras, où elles seront incorporées naturellement, voire artificiellement à des taux compatibles avec la législation sur les additifs.

Parmi les traceurs possibles, nous distinguerons donc deux grands groupes, les traceurs "lipidiques" qui seront des éléments des corps gras naturels et les traceurs non lipidiques, composés non gras obtenus généralement par synthèse, solubles dans ceux-ci et dont l'utilisation est ou pourrait être admise par les législations sur les denrées alimentaires.

Cependant, avant d'établir cette distinction entre les substances qui pourraient être envisagées comme traceurs possibles, sur la base de leur origine lipidique ou non lipidique, il est nécessaire de signaler qu'une série de substances d'origines diverses ont déjà été et parfois sont toujours utilisées pour "marquer" soit la graisse de beurre, soit certains corps gras alimentaires.

Tels sont les révélateurs des margarines, les traceurs de la matière grasse butyrique à base de composés phénoliques ou aromatiques, de stérols, d'antioxydants et de pigments utilisés sporadiquement, et certains produits naturels dont on escomptait, bien que n'étant pas de véritables traceurs, un certain effet de "marquage".

1. Les substances utilisées comme traceurs

1.1. Les révélateurs des margarines

La margarine n'était au départ qu'une copie plus ou moins conforme du beurre.

Actuellement encore, ses fabricants font de grands efforts pour obtenir un produit qui imite le plus parfaitement l'aspect et les qualités organoleptiques de celui-ci, afin de mieux le concurrencer.

Les margarines sont actuellement le plus souvent préparées à partir de graisses végétales et d'huiles marines hydrogénées. Elles sont beaucoup moins chères que le beurre, et en conséquence, de tout temps, on a tenté de les utiliser comme moyen de falsification. Aussi, toutes les législations des pays occidentaux ont-elles prévu l'addition de révélateurs aux margarines, afin de pouvoir déceler facilement leur présence dans un beurre. Ces révélateurs sont de deux types, les amidons et l'huile de sésame.

1.1.1. Les amidons comme révélateurs: avantages et inconvénients

Les amidons de céréales et la fécule de pomme de terre sont toujours préconisés comme révélateurs des margarines dans divers pays de la C.E.E. à des doses variant de 2 à 5%.

Ces composés sont décelés facilement à des taux environ cent fois moindres, ce qui permet la mise en évidence de 1% de margarine contenant 2% d'amidon de riz dans un beurre normal.

La séparation des grains d'amidon est effectuée après extraction des graisses dans un solvant organique, précipitation du résidu de caséine en milieu acide et centrifugation. Afin d'éviter l'hydrolyse des grains, le chauffage doit être modéré. La détermination des grains d'amidon se fait par voie microscopique ou après formation d'empois par coloration en solution iodée, voire après saccharification en milieu acide fort, par le dosage des sucres formés.

a) Avantages

La fécule et les amidons présentent des avantages certains comme traceurs, tant du point de vue analytique que du point de vue économique.

Premièrement, les méthodes analytiques sont au point et couramment utilisées dans de nombreux laboratoires, et elles n'exigent qu'un matériel relativement simple. La sensibilité permise par ces méthodes est très grande, mais la méthode peut paraître longue et demande beaucoup de soins.

Le prix de la dénaturation est dérisoire.

b) Inconvénients

1. Les féculés et les amidons ne sont pas lipophiles. Leur utilisation a été prévue comme traceurs d'une graisse préparée contenant 82% de matière grasse et 18% de non-gras et non comme traceurs d'un corps gras pur. Il est relativement facile de les séparer de la matière grasse; c'est d'ailleurs grâce à cette séparation facile que la sensibilité de la méthode de mise en évidence est si grande.

En fait, les amidons et les féculés ne peuvent être de véritables traceurs de la matière grasse puisqu'ils n'y sont pas solubles.

2. Il existe plusieurs types d'amidon ou de fécule industrielle, qui sont plus ou moins dispersables dans la phase grasse.

3. Les amidons et la fécule sont particulièrement fermentescibles et peuvent favoriser une altération rapide des qualités organoleptiques de la graisse.

L'inconvénient majeur est sans aucun doute la possibilité d'éliminer le traceur par lavage à l'eau.

Si le produit anhydre peut être incorporé dans la phase grasse et n'est pas facilement extrait directement par un simple lavage à l'eau tiède, il est toujours possible de l'hydrolyser à chaud par contact prolongé avec l'eau et de l'éliminer par des lavages systématiques.

1.1.2. L'huile de sésame comme révélateur: avantages et inconvénients

L'huile de sésame a été préconisée comme révélateur des margarines en raison de la sensibilité de détection que permettent les tests de Villavecchia et de Baudoin.

Ceux-ci sont basés sur la réaction avec le furfurol du sésamol, composé phénolique typique de l'huile de sésame.

En milieu acide acide, cette réaction donne lieu à une coloration rouge intense.

L'huile de sésame a été et est encore utilisée dans plusieurs pays comme révélateur des margarines à des doses de 2,5 à 5% dans celles-ci. Elle a été utilisée en Belgique au taux de 3%, comme traceur des beurres fondus.

a) Avantages

Ceux-ci découlent essentiellement de la sensibilité analytique et de la simplicité de la méthode de mise en évidence.

b) Inconvénients

1. Les huiles de sésame peuvent réagir avec des sensibilités très variables au test de Villavecchia, car elles contiennent, naturellement ou

après raffinage des quantités très différentes de produits réactionnels

2. L'huile de sésame contient du sésamol (méthylène 3 - 4 dioxy phénol) donnant directement la réaction de Villavecchia et de la sésamoline (2(3 - 4 méthylène dioxyphénoxy) 6 (3 - 4 méthylène dioxyphényl) cis 3 - 7 dioxa bicyclo 3 - 3-Octane) qui ne donne la réaction qu'après hydrolyse préalable.

Le raffinage peut éliminer entièrement le sésamol libre, mais ne permet pas l'élimination complète de la sésamoline.

3. La coloration rose en elle-même n'est pas absolument caractéristique, surtout si le beurre contient des pigments
4. L'huile de sésame est plus chère que la plupart des graisses végétales entrant dans la composition des margarines, mais beaucoup moins chère que la graisse butyrique.

En conséquence, s'il y a peu de risques que la dose préconisée légalement comme révélateur des margarines soit dépassée, il en est tout autrement pour le "marquage" des beurres, où toute addition supplémentaire d'huile de sésame est susceptible d'apporter un bénéfice.

Cette observation n'a pas manqué d'échapper aux "fondeurs" de beurre et on a constaté que les 3% d'huile de sésame préconisés pour le "marquage" du beurre fondu dans certains pays, étaient constamment dépassés; un contrôle exact de la quantité d'huile de sésame ajoutée au beurre s'est avéré très difficile, voire impossible.

Les réactivités différentes au test de Villavecchia des huiles de sésame, les possibilités de modifier cette réactivité par le chauffage, de même que la spécificité du test qui n'est pas absolue et qui peut être source d'ambiguïté aux faibles concentrations, sont à l'origine d'une diminution progressive de l'utilisation de l'huile de sésame comme révélateur des margarines. D'autre part, le développement des méthodes analytiques utilisées, particulièrement pour la détermination des acides gras et des stérols, rend moins nécessaire l'addition de révélateur aux margarines.

Quant à l'utilisation de l'huile de sésame comme traceur des "butter oils", c'est avant tout, parce que son prix en favorisait une addition excessive et non contrôlable qu'elle a été rapidement rejetée.

1.2. Les traceurs utilisés pour la matière grasse butyrique

Ces traceurs ont fait l'objet de divers règlements élaborés par la Commission des Communautés Européennes en 1969 et 1970.

1.2.1. Les traceurs prévus par les règlements C.E.E. 1390/69 et 1732/69

Ce sont le sésamol, la vanilline et le bêta sitostérol.

L'utilisation de ces traceurs a fait l'objet d'une étude détaillée publiée dans les Informations internes sur l'Agriculture n° 74 mai 1971 de la Commission des Communautés européennes. Nous nous bornons ici à en dégager les conclusions essentielles en fonction des trois critères essentiels requis pour qu'un composé non toxique puisse être considéré comme bon traceur, soit la facilité et la sensibilité de la détermination, la non "éliminabilité" de la matière grasse par voie économique, le prix du "marquage" économiquement acceptable.

a. Le sésamol

Doses préconisées par les règlements C.E.E.: 100 ou 200 grammes par tonne.

Ce traceur est facilement décelable dans une graisse et la sensibilité de la méthode analytique est excellente. Par contre, il peut être éliminé des corps gras par des procédés de désodorisation ou même par lavages alcalins systématiques.

Le prix du "marquage" est relativement élevé mais acceptable.

b. La vanilline

Doses préconisées par les règlements C.E.E.: 200 grammes par tonne.

Ce traceur possède des avantages analytiques analogues à ceux du sésamol et peut en outre être décelé par l'odorat.

Les inconvénients sont par contre plus nets, car la vanilline est plus soluble dans l'eau et les bases faibles que le sésamol.

Le prix du "marquage" est peu élevé et économique.

c. Le bêta sitostérol

Doses préconisées par les règlements C.E.E.: 300 grammes par tonne, ultérieurement 500 et 600 grammes par tonne.

Le bêta sitostérol est facilement décelable dans les corps gras, mais son analyse est beaucoup plus onéreuse que celle des traceurs précédents. Il n'est pas économiquement éliminable de la matière grasse.

Le prix de revient du "marquage" au bêta sitostérol est plus élevé que celui du "marquage" à la vanilline et moins élevé que celui du "marquage" au sésamol.

Il est parfaitement acceptable économiquement.

d. L'éthoxyquine

Doses préconisées par les règlements C.E.E.: 150 grammes par tonne.

Analytiquement, il s'agit d'un traceur dont la sensibilité de détection est très grande et très simple. C'est un traceur "immédiat", dont la

mise en évidence ne requiert que l'examen sous une simple lampe U.V. Par des méthodes dont le principe est simple, mais dont l'exécution sans séquelles pour la qualité des corps gras est difficile, il peut être presque entièrement éliminé des corps gras.

Le prix du "marquage" du beurre par l'éthoxyquine est dérisoire.

Ce traceur fut prévu uniquement pour les graisses butyriques destinées à la consommation animale.

e. La chlorophylle E 140

Doses préconisées par les règlements C.E.E.: 8 grammes chlorophylle pure par tonne.

Ce traceur est un mauvais traceur du point de vue des trois critères examinés.

Analytiquement, aux doses indiquées, il est difficilement estimable. Il est non seulement facilement éliminable par des procédés de blanchiment mais il est dégradé très rapidement dans les beurres, étant très sensible à l'oxydation et à la chaleur.

Enfin pour être analytiquement efficace, la dose de traceur doit être beaucoup plus élevée que celle qui a été préconisée, ce qui rend le prix du "marquage" prohibitif.

La chlorophylle E 140, comme l'éthoxyquine fut réservée uniquement au "marquage" des graisses destinées à la consommation animale.

1.2.2. Autres traceurs utilisés sporadiquement

Comme traceur à caractère immédiat, les pays de la C.E.E. ont également utilisé sporadiquement des caroténoïdes, notamment l'ester éthylique de l'acide bêta apo 8' caroténoïque.

Le taux de traceur incorporé au beurre était de six grammes par tonne. Ce traceur dont on escomptait une détermination rapide et facile "de visu" ne fut jamais efficace.

En effet, la coloration orangée donnée par le taux prescrit n'était pas suffisamment différente de la coloration naturelle de certains beurres ou de la coloration permise à l'aide de colorants naturels (rocou).

D'autre part, ce produit appartenant à la famille des caroténoïdes, il était très facile d'en diminuer considérablement le taux par raffinage ou même de le détruire par chauffage.

Comme les chlorophylles ou tous les composés de la famille des pigments, ces composés sont particulièrement instables et se laissent difficilement déterminer avec une précision suffisante.

1.3. Les mélanges de matière grasse butyrique et de substances non grasses

Ces dernières années, une partie des stocks excédentaires de beurre dans divers pays de la C.E.E. a été dénaturée par addition de substances non grasses, principalement du sucre et des protéines. Les quantités de non gras pouvaient être fort importantes, atteignant 50% ou d'avantage du produit.

Ces produits étaient destinés à la pâtisserie ou à diverses industries alimentaires.

On escomptait par ces opérations écouler une bonne partie des excédents et on estimait que, même si industriellement la séparation de la matière grasse restait relativement facile, celle-ci ne serait pas réalisée, car il fallait aussi récupérer et faire un usage de la phase non grasse dont le prix n'était pas négligeable.

Nous ne pouvons juger ces opérations, toute appréciation devant tenir compte de contingences économiques variables.

D'un point de vue analytique, les protéines et le sucre n'étant pas solubles dans la phase grasse ne peuvent être considérés comme des traceurs. Si on veut les utiliser comme moyens pour dénaturer les beurres, il faut garder à l'esprit le fait qu'ils peuvent être séparés très facilement des corps gras. Dès lors, la graisse butyrique peut rentrer frauduleusement dans le circuit normal du beurre dont on a voulu l'éloigner. Les protéines pourront toujours être utilisées dans l'alimentation animale. Le sucre, quant à lui, en solution concentrée, pourra être destiné à des préparations alimentaires, voire à l'industrie de la fermentation.

La dénaturation à l'aide de sucre, d'un point de vue pratique, serait sans doute plus efficace que la dénaturation à l'aide de protéines. Cependant, en raison des risques courus de récupération, il nous paraît indispensable qu'elle porte sur des quantités réduites et qu'elle s'échelonne sur un temps très court.

1.4. Les arômes acides des "Ghee"

Les habitudes alimentaires de nombreux pays en voie de développement portent ceux-ci vers la consommation de graisses acidifiées qui ont un goût de rance, les "ghee". Le "ghee" oriental est habituellement préparé à partir du lait par fermentation acide naturelle, barattage et chauffage des grains de beurre sans lavage. Dans nos pays, il est produit uniquement pour l'exportation, à partir de graisse de beurre ordinaire, additionnée de produits d'arôme spécialement conçus, l'élément

aromatique principal étant l'acide butyrique.

Certains "ghee substitute" sont préparés à partir de mélanges de graisses animales et végétales.

Les "ghee aroma" ne peuvent être considérés comme traceurs. En effet, l'acide butyrique libre des "ghee" peut être facilement enlevé par neutralisation et lavage et également par désodorisation.

2. Les traceurs lipidiques

Ces traceurs sont des substances, qui dans la nomenclature chimique, sont reprises dans la classe des lipides.

La classe des lipides naturels comprend des lipides simples et des lipides complexes. Les lipides simples sont des esters d'alcool et d'acides gras. Suivant que l'alcool sera le glycérol, un stérol ou un alcool gras, il s'agira d'un glycéride, d'un stéride ou d'un céride.

Les lipides complexes donnent à l'hydrolyse une fraction alcoolique, une fraction acides gras et une fraction non grasse. Suivant la nature de cette dernière fraction, on distingue:

- les phospholipides qui contiennent un groupe phosphate
- les cérébrosides et les gangliosides qui donnent à l'hydrolyse des hydrates de carbone
- les sulfatides possédant un groupe sulfate.

Les lipides naturels contiennent encore une partie non saponifiable dans laquelle on trouve des stérols, des alcools à longue chaîne, des hydrocarbures, des vitamines et bon nombre de composés qui ne sont pas toujours identifiés.

Notons qu'à côté de ces produits naturels, l'industrie des corps gras alimentaires prépare ou synthétise pour ses besoins un certain nombre de composés, peu représentés naturellement, mais utilisés biologiquement comme les produits naturels. Nous pensons aux glycérides de synthèse, aux glycérides hydrogénés ou interestérifiés, aux acides trans, aux monoglycérides, aux diglycérides, aux saccharoglycérides, ces trois derniers composés étant particulièrement utilisés comme agents émulsificateurs.

Il est évident que pour le choix d'un "traceur lipidique", on dispose de nombreuses orientations possibles et on peut envisager séparément chaque classe de lipides. Cependant, si la séparation des composés lipidiques par classe est analytiquement souvent facile, industriellement les procédés peuvent être coûteux et ne sont pas toujours réalisés. Pour tracer un beurre, on aura intérêt, si c'est possible, à utiliser un autre corps gras naturel dont un élément décelable avec une haute sensibilité par l'analyse distingue nettement sa composition de celle du beurre.

Il est donc souhaitable de considérer premièrement les corps gras qui possèdent certaines réactions caractéristiques permettant de les repérer facilement au sein d'un mélange de graisses naturelles.

2.1. Les corps gras alimentaires comme traceurs des beurres

Avant d'aborder ce chapitre, il est nécessaire de fixer une limite au taux de graisse alimentaire admissible dans un beurre tracé. Cette limite répondra d'abord à des exigences psychologiques. Il est difficilement concevable qu'on livre dans le commerce comme graisse de beurre un produit qui contiendrait 5% ou plus de 5% de graisse étrangère, et nous ne croyons pas qu'il soit indiqué de dépasser 3%.

D'autre part, le "marquage" du beurre doit permettre la détection de 5% de beurre tracé mélangé dans un beurre normal, c'est à dire que le traceur doit pouvoir être mis en évidence à un taux vingt fois moindre que celui préconisé au "marquage". Cette condition restreint fortement les possibilités d'utilisation de beaucoup d'huiles alimentaires comme traceurs.

Dans ce chapitre, nous examinerons successivement une série de corps gras alimentaires en fonction de leurs propriétés analytiques permettant de les mettre en évidence dans un mélange de lipides, soit les corps gras déterminables grâce à une réaction colorée spécifique, les corps gras déterminables par leur composition originale en acides gras et les corps gras déterminables par la composition particulière de leur insaponifiable.

2.1.1. Les corps gras déterminables dans les beurres par une réaction colorée spécifique

a. L'huile de sésame

Cette huile est encore exigée dans certains pays comme révélateurs des margarines. Elle contient trois composés décelables par des tests relativement simples, le sésamol, la sésamoline et la sésamine.

Le test de Villavecchia décèle le sésamol et la sésamoline: le test de Fabris décèle la sésamine.

Le sésamol est totalement éliminable au raffinage, la sésamoline l'est beaucoup moins et la sésamine se retrouve pratiquement intacte après raffinage.

Le test de Fabris est moins utilisé que le test de Villavecchia car il est plus encombrant, mais il peut cependant mieux caractériser certaines huiles raffinées.

L'huile de sésame utilisée en tant que traceur dans le beurre a présenté de nombreux inconvénients qui ont été décrits au chapitre 1.1.2.

b. L'huile de coton

L'huile de coton brute contient des acides cyclopropéniques, en particulier les acides sterculique et malvalique, donnant une coloration rouge avec le réactif d'Halphen. Cependant les acides sterculique et malvalique

sont détruits par simple chauffage à 170°C. Le raffinage peut les éliminer pratiquement entièrement, de sorte qu'on trouve des huiles de coton à peine réactionnelles. D'autre part, l'huile de coton brute contient un composé biologiquement indésirable, le gossypol.

c. Les huiles de kapok, de baobab et de thé

Ces huiles présentent également des réactions colorées plus ou moins spécifiques, mais leur nature, leur disponibilité, et leur prix commercial, de même que la sensibilité du test sont incompatibles avec leur utilisation comme traceurs du beurre.

De manière générale, les réactions colorées des huiles alimentaires sont basées sur des composés en grande partie détruits ou éliminés par le raffinage. Leur interprétation est délicate et donnerait souvent lieu à des contestations, sinon aux doses qui pourraient être admises pour tracer le beurre, au moins au vingtième de ces doses, pour la mise en évidence de 5% d'un beurre tracé dans un beurre normal. D'autre part, étant moins chères que la graisse de beurre, elles incitent à la fraude par excès de traceurs, excès qui pourrait être difficilement contrôlé.

Si les composés des huiles qui sont à la base des réactions colorées spécifiques peuvent être isolés ou préparés par synthèse, et s'ils ne sont pas détruits ou éliminés par des procédés simples de raffinage, il est évident que l'on pourrait envisager leur utilisation avec la certitude d'une efficacité bien meilleure que celle permise par l'utilisation des huiles elles-mêmes.

2.1.2. Les corps gras déterminables dans les beurres par la nature de leurs fractions lipidiques

a. Les triglycérides

On entend généralement par corps gras alimentaires des graisses ou huiles presque exclusivement composées de triglycérides. Toutefois, outre les triglycérides, les corps gras contiennent également des glycérides partiels, des phosphatides et d'autres lipides simples, et des lipides complexes.

Il n'y a pas de méthode analytique qui donne entière satisfaction pour l'analyse des triglycérides.

Ceux-ci sont séparés suivant leur polarité et le degré d'insaturation en chromatographie sur colonne ou sur couche mince, ou suivant leur poids moléculaire en chromatographie gazeuse. Mais la gamme des triglycérides des corps gras naturels est trop étendue pour que ces séparations soient satisfaisantes dans des conditions usuelles d'analyse pour le domaine qui

nous préoccupe.

Notons cependant que si les triglycérides possèdent des acides gras hydroxylés, leur polarité est fort différente des triglycérides ordinaires et ils peuvent facilement être mis en évidence par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

La polarité particulière des triglycérides de l'huile de ricin (principalement de la triricinoléine) pourrait rendre celle-ci utilisable comme traceur du beurre. (Chap. 2 - I)

b. Les glycérides partiels

Les mono et diglycérides du lait frais sont probablement des précurseurs naturels des triglycérides. Dans le lait frais, les monoglycérides ne se trouvent qu'à l'état de traces, environ 0,05 gr pour 100 grammes de matière grasse tandis que le taux de diglycérides, essentiellement des 1 - 2 diglycérides, est de l'ordre de 1 à 2%, voire davantage suivant divers auteurs.

Les taux de mono et diglycérides sont plus importants dans le beurre, surtout si la matière grasse a subi une certaine lipolyse; exceptionnellement le taux des monoglycérides de la graisse butyrique rance peut atteindre 0,3 à 0,4% dans les beurres, et il atteint normalement 1 à 3% dans les fromages. Les glycérides partiels peuvent être séparés des triglycérides ordinaires par des procédés analytiques simples de chromatographie; les monoglycérides, après séparation, peuvent être dosés par oxydation périodique.

Bien que certaines graisses naturelles soient très riches en glycérides partiels, il n'est pas concevable de les utiliser telles quelles comme traceurs possibles du beurre, étant donné que leur composition lipidique variera suivant le traitement de la matière grasse.

Peut être, pourrait-on envisager d'utiliser des monoglycérides ou diglycérides industriels, mais la question de leur destin au travers des manipulations subies par les corps gras se pose avec acuité. (Chap. 2-2-III)

c. Les phosphatides

Le lait de vaches contient environ 0,35 gr de phosphatides par litre, soit approximativement 10 gr par kg de matière grasse. Dans le beurre, on n'en retrouve plus cependant qu'environ 2 gr par kg, la plus grande partie des phospholipides étant passée dans le babeurre.

Les phospholipides peuvent être séparés de la matière grasse par des techniques de chromatographie ou mesurés directement par dosage du phosphore total.

L'huile d'oeuf est très riche en phosphatides (30% des lipides totaux de

l'oeuf) et la détermination de la teneur en jaune d'oeuf des poudres d'oeuf peut être basée sur cette composition particulière.

Les techniques analytiques sont cependant onéreuses et doivent être effectuées par des manipulateurs exercés. L'interprétation des résultats n'est pas facile. (Chap. 2-2-V)

d. Les stérides et les cérides

Ces composés sont hydrolysables en stérols ou alcools supérieurs et en acides gras. Les méthodes d'identification de ces composés seront basées sur l'analyse des stérols, des alcools et des acides gras.

Parmi les stérols du beurre, il y a environ 10% de stérols liés (stérides) et 90% de stérols libres (cholestérol). Les proportions de stérols liés ou libres sont extrêmement variables selon la nature des corps gras et les méthodes de détermination sont longues et onéreuses.

Les cires ne sont pas des produits alimentaires et leur composition est encore souvent insuffisamment connue. Le contrôle de la pureté des composés commerciaux est très difficile, ce qui exclut également leur utilisation pour le "marquage" des matières grasses alimentaires, dans le but de faciliter analytiquement le contrôle.

e. Les lipides complexes

Ce sont les sulfatides, les gangliosides et les cérébrosides. Ces lipides sont encore insuffisamment connus, tant du point de vue de la composition, de l'action biologique, de la présence dans de nombreux corps gras et de la recherche analytique, pour pouvoir espérer en faire un usage actuel en tant que traceurs des beurres.

Notons la fabrication industrielle en tant qu'agent émulsifiant de saccharoglycérides, produits assimilables et reconnus non toxiques par les législations sur les denrées alimentaires.

Ces produits, en raison de leur polarité peuvent être séparés facilement des autres lipides du beurre par des techniques de chromatographie; malheureusement, il peuvent être hydrolysés facilement à chaud en milieu légèrement alcalin ou en milieu acide (Chap. 2-2-IV).

2.1.3. Les corps gras déterminables dans les beurres par leur composition en acides gras

Les corps gras dont il est question dans ce chapitre doivent pouvoir être décelés à des taux infimes de l'ordre de 0,25% maximum dans un beurre normal, ce taux correspondant à la présence de 5% de beurre tracé par 5% de graisse de marquage, dans un beurre normal.

L'analyse des acides gras en chromatographie gazeuse est devenue une ana-

lyse de routine de la chimie des corps gras et son utilisation s'est généralisée dans les laboratoires de contrôle des denrées alimentaires.

On peut imaginer de tracer la graisse de beurre avec un acide gras (inclus dans un glycéride) qui ne s'y trouve pas naturellement ou du moins qui s'y trouve à des taux insignifiants.

On cherchera, premièrement parmi les graisses alimentaires naturelles, celles qui contiennent un acide gras original à un taux élevé, afin de le déterminer d'autant plus aisément lorsqu'il sera dilué parmi les acides gras du beurre.

L'éventail d'acides gras de la graisse butyrique est cependant un des plus complets qui existe dans la nature.

Tous les acides saturés de chaîne carbonée normale de C4 à C26 en même temps qu'un nombre élevé d'acides ramifiés et d'acides insaturés ont été décelés dans la graisse de beurre.

Pour certains acides cependant, les taux présents n'atteignent que des traces, soit des quantités ne dépassant pas 0,1%. C'est parmi ces acides "mineurs" qu'il est nécessaire de chercher les éléments pouvant être utilisés comme traceurs. En effet, si on considère que le taux maximum admissible de graisse étrangère dans le beurre pour le "marquer" est de l'ordre de 3 ou 4%, que ce taux doit permettre la détection de 5% de beurre tracé dans un beurre normal et que la précision et la reproductibilité des mesures obtenues pour les acides mineurs sont limitées, on ne peut concevoir que difficilement l'utilisation comme élément traceur du beurre, d'un acide gras qui s'y trouverait naturellement à un taux de plus de 0,1% de l'ensemble des acides gras.

Pour les acides inférieurs, on pourrait penser dès l'abord à un enrichissement de l'élément à doser, par distillation ou entraînement à la vapeur des acides libérés après hydrolyse. Cependant, cette méthode serait longue et fastidieuse, pratiquement inutilisable en contrôle courant, à l'exception peut être de l'acide acétique qui peut être distillé en mélange azéotrope avec l'eau et qui serait mesuré par titrimétrie.

Sur la base de la composition des acides gras des corps gras donnée par le "Codex alimentarius" et les manuels d'analyses alimentaires, aucune des huiles suivantes, ne contient des acides gras inconnus ou sous forme de traces (taux inférieur à 0,1%) dans le beurre:

- parmi les graisses végétales :

les huiles de palme, de coco, de palmiste, de beurre de cacao, de karité, huiles d'olive, d'amande, de noix, de noisette, de thé, de sésame, de riz, de maïs, de tournesol de soja, de carthame, de pépins de raisins, d'oeillette, de lin ;

- parmi les graisses animales :

les suifs de boeuf et de mouton, le saindoux et la graisse de cheval, l'huile d'oeuf.

Ces corps gras sont donc pratiquement inutilisables comme traceurs du beurre sur la base de la composition en acides gras.

Par contre la composition particulière des acides de l'huile de coton, de l'huile d'arachide, de l'huile de colza, des huiles riches en acides conjugués, de l'huile de ricin et de certaines huiles marines est susceptible de retenir l'attention.

a. L'huile de coton

Les acides particuliers de l'huile de coton sont des acides cyclopropéniques, dégradables par la chaleur et susceptibles d'être éliminés par le raffinage. Ils se trouvent d'ailleurs en proportions assez faibles dans l'huile de coton (1 à 2%) et ne sont pas déterminés usuellement par des méthodes de chromatographie gazeuse.

b. L'huile d'arachide

Cette huile est caractérisée par la présence d'acide arachidique, d'acide béhénique et d'acide lignocérique en quantités supérieures à des traces, mais de toute manière variables, et peu importantes. L'acide béhénique, en particulier peut atteindre des teneurs allant de 2 à 5% des acides gras totaux. Les acides arachidique et lignocérique sont en proportions moindres.

Il y a environ 0,1% d'acide béhénique dans le beurre, mais sans étalon interne, il n'est pas possible d'obtenir une mesure correcte; par ailleurs les proportions d'acide béhénique sont vraiment trop faibles dans l'huile d'arachide et les difficultés analytiques de l'analyse des acides supérieurs sont trop grandes pour qu'on puisse utiliser l'huile d'arachide comme traceur des beurres.

c. L'huile de colza

L'huile de colza et les huiles de crucifères (navette, moutarde) sont caractérisées par une très forte teneur en acide érucique, acide pratiquement absent dans le beurre (taux inférieur à 0,05%). Malheureusement la teneur en acide érucique de l'huile de colza est assez variable, la sélection s'efforçant de diminuer de plus en plus cette teneur en acide érucique souvent considérée comme facteur de dépréciation de l'huile.

Ainsi, pour les colzas européens, la teneur moyenne en acide érucique était de l'ordre de 40 à 50% en 1972, mais le Canada suivi par de nombreux autres pays producteurs commence à produire des huiles de variétés, telle la "Canbra", à teneur presque nulle en acide érucique. Il faudrait donc spécifier la teneur en acide érucique de l'huile de colza utilisable comme traceur.

Une teneur minimum de 40% d'acide érucique de l'huile utilisée en vue du "marquage" du beurre serait souhaitable. Dans ce cas, le contrôle du "marquage" serait basé sur les teneurs relatives comparées des acides C22 et C22:1 établies par chromatographie gazeuse des acides gras. Dans un beurre normal, C22/C22:1 est toujours plus grand que 1. Si on marque le beurre par 3% d'huile de colza, et dilue 5% de beurre tracé dans un beurre pur, ce rapport ne sera plus vérifié dans le produit fini.

Le critère tient compte de conditions particulières qui pourraient exister pour le régime alimentaire des vaches (régime contenant au maximum 1,5 kg tourteaux/vache/jour), à condition que le régime reste normal (alimentation équilibrée sans excès d'huile).

d. Les huiles riches en acides conjugués (Tung, oiticica)

Les acides polyinsaturés conjugués possèdent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'U.V. Ces spectres se déplacent d'autant plus vers les grandes longueurs d'onde que le nombre de doubles liaisons est élevé. De même les isomères cis ont des spectres différents des isomères trans. L'absorption U.V. augmente également avec le degré d'insaturation; les composés cis présentent des extinctions spécifiques supérieures à celles des composés trans correspondants.

L'huile de tung et l'huile d'oiticica ont des teneurs en acides polyinsaturés de l'ordre de 50 à 80%.

L'huile de tung contient principalement de l'acide éléostéarique, ou 9 cis, 11 trans, 13 trans octodécatriénoïque. L'huile d'oiticica contient principalement de l'acide licanique qui est l'acide 4 cétoéléostéarique.

Ces huiles végétales ne sont pas utilisées comme huiles alimentaires, mais plutôt comme huiles siccatives pour les peintures et vernis.

Il est à noter que la graisse de beurre peut contenir des proportions appréciables de diènes conjugués (en moyenne 1 à 2%) mais ne contient jamais que des traces d'acides triènes conjugués (moins de 0,05%).

Le maximum d'absorption dans l'U.V. dû aux acides diénoïques du beurre se situe vers 231 nm, tandis qu'il se situe au delà de 270 nm pour

l'acide éléostéarique, ce qui peut simplifier les déterminations. Cependant, les acides polyinsaturés sont éminemment oxydables et sensibles à la chaleur qui favorise leur polymérisation. Ils s'hydrogènent facilement et sélectivement.

L'absorption dans l'U.V. est le fait de multiples composants des corps gras en dehors des acides polyinsaturés conjugués. Il y a l'absorption de fond due à l'huile et l'absorption due au solvant. Il existe des absorptions différentes des échantillons de graisse butyrique non seulement suivant la teneur en acides conjugués, mais aussi suivant la teneur en pigments et le degré d'oxydation.

Il peut y avoir absorption due à des additifs comme les antioxydants. Au total, l'absorption U.V. des acides polyinsaturés paraît peu spécifique et ceux-ci semblent trop instables pour qu'on puisse fonder une méthode analytique efficace de "marquage" sur ces propriétés. Les acides polyinsaturés conjugués pourraient pourtant être étudiés en tant que traceurs presque "immédiats".

Il suffirait de dissoudre la matière grasse dans un solvant et d'observer à une longueur d'onde appropriée, par exemple 280 nm, l'absorption maximale de fond due à un beurre normal et l'absorption due aux graisses tracées par addition de corps gras contenant des proportions importantes d'acides conjugués.

e. L'huile de ricin

L'huile de ricin contient en proportions supérieures à 80% des acides gras, un acide hydroxylé insaturé caractéristique, l'acide ricinoléique ou acide 12 hydroxy 9 octadécénoïque. Les triglycérides sont principalement de la triricinoléine.

L'huile de ricin a des propriétés laxatives bien connues et est utilisée comme telle en pharmacie. Il n'empêche qu'elle a été utilisée de tout temps en Chine comme huile alimentaire.

L'huile de ricin hydrogénée perd presque entièrement ses propriétés laxatives et on l'utilise dans l'industrie comme telle ou sous forme de monoglycérides et de diglycérides pour communiquer des qualités appropriées aux produits alimentaires (agents épaississants, émulsificateurs).

La teneur en acide ricinoléique des huiles de ricin peut être contrôlée par chromatographie gazeuse et l'utilisation d'une phase apolaire plus résistante aux hautes températures que les phases polaires se justifie si on veut procéder à un contrôle rapide.

Cependant, le taux d'acide ricinoléique ajouté dans les beurres à des

doses voisines de 1%, serait difficilement contrôlable. En effet, si on utilise une colonne polaire, la résistance aux hautes températures de celle-ci est généralement beaucoup trop faible pour pouvoir obtenir une analyse rapide et efficace; si on utilise une colonne apolaire, la séparation de l'acide ricinoléique de plusieurs acides à 20 atomes de carbone de la matière grasse butyrique est insuffisante.

En réalité, il est plus simple et plus efficace de mettre en évidence la triricinoléine.

Celle-ci en raison de son caractère polaire se sépare facilement des autres triglycérides en chromatographie sur couche mince.

L'huile de ricin et l'huile de ricin hydrogénée peuvent donc être considérées comme traceurs possibles des beurres. Ce problème sera envisagé au chapitre 2-2-I

f. Les huiles marines

Les huiles marines comprennent les huiles de mammifères marins (cétacés phoques) et les huiles de poissons.

Du point de vue de leurs compositions en acides gras, elles se caractérisent généralement par leur insaturation et la présence de nombreux acides supérieurs non toujours identifiés, à 20 et 22 atomes de carbone.

Cependant les huiles marines ne peuvent être utilisées dans les produits alimentaires que fortement hydrogénées et raffinées, afin de leur faire perdre leur odeur caractéristique. L'hydrogénation est le plus souvent loin d'être conduite à son terme, ce qui donnerait une graisse trop dure, et les proportions des acides non saturés et saturés supérieurs sont très variables.

Les huiles de poissons riches en C22 seraient les plus aisément déterminables, mais la technique, bonne en principe, si on exige uniquement de déterminer la présence de l'huile de poisson dans le beurre, ne permettrait pas le contrôle même approximatif des quantités ajoutées. Plus intéressantes à cet égard sont les graisses d'animaux marins comme les dauphins ou les marsouins dont la composition reflète une teneur originale et importante d'acide isovalérique (ca 25%). Cet acide n'existe pas dans le beurre et il pourrait être facilement et rapidement mis en évidence par chromatographie gazeuse dans un beurre tracé. Cependant, ces huiles ne se rencontrent guère dans le commerce. Il faudrait d'ailleurs constater la constance de leur proportion en acide isovalérique, constance qui n'est nullement prouvée à l'heure actuelle.

De toute manière, l'utilisation éventuelle d'huile de dauphin hydrogénée comme traceur du beurre devrait être poussée au maximum admissible, c'est à dire environ 3 à 4% (ca 1% d'acide isovalérique) pour être analytiquement efficace.

Enfin, il faut considérer que les huiles de dauphin, si on peut les obtenir commercialement en quantités suffisantes, risquent d'être beaucoup moins chères que la graisse de beurre et il y a toujours lieu de craindre le "marquage" par excès de traceurs.

Conclusions

Sur la base de l'analyse des acides gras, l'huile de colza et l'huile de ricin sont, parmi les huiles alimentaires courantes, les plus facilement décelables à des taux minimales dans les beurres.

Comme elles sont relativement riches en phytostérols, leur présence dans un beurre pourra être confirmée par l'analyse des stérols. L'huile de dauphin hydrogénée, si elle est commercialement disponible, pourra également revêtir un certain intérêt. Par contre, l'utilisation en tant que traceurs pour la graisse de beurre d'huiles de poissons et d'huiles riches en acides polyinsaturés conjugués, présenterait des difficultés importantes.

Le grand inconvénient en ce qui concerne l'utilisation des corps gras naturels comme traceurs du beurre, réside dans les variations possibles de teneurs de l'élément traceur dans ces corps gras, variations qui rendent problématique un contrôle efficace du "marquage". Si on peut remédier avec une efficacité suffisante à cet inconvénient en ce qui concerne l'huile de colza et l'huile de ricin, le problème est plus difficile pour les autres corps gras cités; dans ce cas, une addition excédentaire de traceur, lucrative, puisque la graisse de beurre est de loin plus coûteuse que les autres corps gras envisagés, sera toujours à craindre.

2.1.4. Les corps gras déterminables dans les beurres par la composition de l'insaponifiable

L'insaponifiable des graisses comporte beaucoup plus d'éléments que la composition glycéridique.

Cependant, il n'y a pas de méthode analytique rapide de l'analyse de l'insaponifiable, et si les méthodes d'analyse quantitative sont actuellement bien codifiées et normalisées, la détermination de l'insaponifiable total d'une graisse reste toujours une méthode longue et onéreuse. Bien que les insaponifiables de certaines huiles végétales ou animales diffèrent fortement en quantité de l'insaponifiable du beurre, ils sont trop variables naturellement ou sous l'influence des processus de raffina-

ge pour qu'on puisse espérer se servir avec efficacité de la mesure de l'insaponifiable total comme principe du contrôle de beurres tracés. Il est plus indiqué d'analyser certains éléments de l'insaponifiable. Parmi les composés de l'insaponifiable des corps gras naturels, il faut citer principalement les stérols, les tocophérols, les alcools gras, les hydrocarbures, les vitamines et des composés à structures diverses, caractéristiques de la composition de certaines huiles.

a. Les graisses déterminables dans le beurre par leur composition en stérols

Ce sont presque essentiellement les huiles végétales.

Celles-ci contiennent toutes du sitostérol et du campestérol, accompagnés le plus souvent de stigmastérol ou d'autres stérols caractéristiques de certains types d'huile, tandis que le cholestérol est presque exclusivement un stérol animal.

L'analyse des stérols par des méthodes chromatographiques permet la mise en évidence de 1% de n'importe quelle huile végétale dans le beurre. En choisissant un taux déterminé d'une huile riche en phytostérols pour marquer un beurre, la sensibilité des méthodes chromatographiques peut naturellement être poussée suffisamment loin que pour déceler le vingtième de ce taux et atteindre ainsi la sensibilité requise pour un bon traceur.

Cependant, la teneur en stérols totaux est encore susceptible de varier suivant les procédés industriels de raffinage; les compositions qualitatives de nombreuses huiles végétales ne diffèrent pas suffisamment l'une de l'autre et le contrôle de la dose d'huile végétale préconisée comme traceur serait aléatoire.

Comme il est commercialement possible de disposer de stérols végétaux relativement purifiés, il est plus indiqué et plus efficace d'utiliser ces stérols commerciaux comme traceurs en les diluant directement dans la graisse butyrique.

Parmi ces stérols commerciaux, le sitostérol est déjà utilisé comme traceur et le stigmastérol pourrait l'être ultérieurement. (Chap. 2-2-VI)

b. Les graisses déterminables dans le beurre par leur composition en tocophérols

On sait que la graisse butyrique et les graisses animales en général sont très pauvres en tocophérols naturels. Pour la graisse butyrique, cette teneur varie d'ailleurs fortement, étant beaucoup moins importante en hiver qu'en été. Suivant la littérature, les variations sont de l'ordre de 20 à 50 mgr/kg. Le tocophérol du beurre est principale-

ment sous forme α . A quelques exceptions près, les huiles végétales contiennent des quantités bien plus considérables de tocophérols, les huiles les plus riches étant les huiles de germes de céréales et l'huile de soja qui contient 2000 à 5000 mgr de tocophérol par Kg, soit environ cent fois plus que la graisse de beurre.

Cependant cette teneur peut varier suivant les conditions industrielles du raffinage et suivant l'état de fraîcheur de l'huile et, de toute manière, la concentration moyenne en tocophérols des huiles brutes est encore trop peu élevée pour que l'on puisse les utiliser efficacement comme traceurs du beurre.

Comme pour les stérols, on pourra obtenir commercialement des concentrés de tocophérols dont l'utilisation comme traceurs éventuels du beurre est naturellement plus judicieuse. (Chap. 2-2-VII)

c. Les graisses déterminables dans le beurre par la composition en alcools gras

Les huiles marines sont caractérisées par leur forte teneur en alcools aliphatiques. Cette teneur subit de grandes variations, non seulement suivant l'espèce, mais aussi au sein d'une même espèce suivant le lieu et l'époque de la pêche.

D'autre part, les teneurs et les compositions des huiles marines et des corps gras alimentaires en général sont encore insuffisamment connues pour permettre leur identification uniquement suivant l'analyse des alcools aliphatiques.

Les huiles végétales contiennent des alcools aliphatiques et des alcools terpéniques.

L'huile de thé peut contenir jusqu'à 0,5% d'alcools terpéniques, principalement du butyrospermol; celui-ci peut être mis en évidence par la réaction colorée de Fitelson.

La présence d'alcools gras est insignifiante dans la graisse de lait. Cependant, l'analyse de ces composés est extrêmement complexe; elle exige toujours des méthodes de séparation fort onéreuses. En principe, on procède premièrement à la séparation de l'insaponifiable total; ensuite les alcools aliphatiques et terpéniques sont séparés par chromatographie en couche mince; enfin chaque classe peut être alors analysée par chromatographie gazeuse dans des conditions voisines de celles utilisées pour les stérols.

On voit donc que la complexité des méthodes analytiques est telle que le prix de l'analyse sera exorbitant et, actuellement au moins, il est illusoire de se baser sur la composition en alcools gras des

graisses naturelles pour tenter de trouver en l'une d'elles un traceur efficace de la graisse de beurre.

Cependant, si certains alcools gras terpéniques, (les plus difficilement extractibles par la vapeur sous vide) pouvaient être commercialement disponibles, particulièrement le butyrospermol et la bêta amyryne, des méthodes analytiques relativement simples pourraient les mettre en évidence dans la graisse de beurre.

d. Les corps gras déterminables dans le beurre par la composition en hydrocarbures

Dans la graisse de beurre, l'hydrocarbure naturel le plus étudié est la carotène. Celui-ci est présent dans la graisse butyrique au taux, variable suivant la saison, de 4 à 12 mg par kg. Il est présent à des taux notablement supérieurs dans de nombreuses huiles végétales (huile de palme).

Cependant le carotène et les caroténoïdes ne peuvent être considérés comme des véritables traceurs. En effet, composés éminemment oxydables, ils sont détruits très facilement et le raffinage des corps gras tend à les éliminer complètement.

Le squalène est un autre hydrocarbure éthylénique présent dans les graisses animales et végétales.

Dans la graisse de beurre, il existe des proportions sensiblement égales d'hydrocarbures saturés et non saturés, dont la teneur suit approximativement les variations de la teneur en carotène.

La détermination du taux de ces hydrocarbures sera en général fort longue car elle exige de multiples séparations (insaponifiable, chromatographie sur couche mince) et des méthodes d'analyse gravimétriques ou colorimétriques.

Les hydrocarbures éthyléniques sont facilement dégradables et les procédés de raffinage affectent fortement les teneurs en hydrocarbures totaux.

e. Les corps gras pouvant être caractérisés par la composition particulière en pigments, vitamines et composés spéciaux

Certains corps gras peuvent être caractérisés par leurs teneurs en pigments (caroténoïdes, chlorophylles), en composés vitaminiques (vitamine A, provitamine D et vitamine D, vitamine E), et autres composés mineurs.

Les pigments sont éliminables au raffinage, tandis que l'utilisation de vitamines n'est guère concevable biologiquement et économiquement pour le "marquage" de beurres vendus à prix réduit. La plu-

part des vitamines liposolubles subissent une dégradation importante lors des traitements industriels de la matière grasse.

2.2. Les composés lipidiques commerciaux

Ces composés pourront être extraits des lipides naturels ou obtenus par synthèse à partir de produits naturels.

Nous étudierons successivement les triglycérides extraits de corps gras naturels ou préparés industriellement, les glycérides partiels dont les monoglycérides, les saccharoglycérides, les phosphatides, les stérols dont le stigmastérol, les concentrats de tocophérols. L'étude sera menée non seulement sur un plan théorique mais se basera également sur les résultats obtenus au cours de nombreux tests et essais.

I. LES TRIGLYCERIDES DES CORPS GRAS NATURELS OU HYDROGENES

Les triglycérides des corps gras naturels peuvent être fractionnés par des méthodes physiques (cristallisation fractionnée, friggellisation, distillation moléculaire) en composés dont les propriétés rhéologiques particulières présentent un intérêt dans l'industrie alimentaire.

Citons les "miglyols" et les produits analogues riches en acide laurique, utilisés entre autres pour l'enrobage des raisins secs.

Cependant, les glycérides séparés industriellement par des méthodes physiques ne sont pratiquement jamais assez riches en ^{un} acide gras déterminé pour que l'on puisse obtenir un composé apte à être utilisé valablement comme traceur des beurres. La raison principale réside dans le fait que les graisses fractionnées sont enrichies en certains acides gras déjà présents dans le beurre en quantité supérieure à des traces. Ainsi, les miglyols, malgré leur richesse inhabituelle en acide laurique, ne pouvaient être acceptés comme traceurs du beurre (1).

Il apparaît rapidement que seuls, parmi les triglycérides, ceux qui sont riches en ^{un} acide inconnu dans le beurre ou simplement présent dans celui-ci sous forme de traces (taux inférieur à 0,1%), pourront constituer des traceurs analytiquement acceptables. Sous ce rapport, l'huile de ricin, riche en acide ricinoléique présente, comme l'huile de colza riche en acide érucique et dont l'utilisation a déjà été envisagée, de très bonnes qualités analytiques.

L'huile de ricin ordinaire et l'huile de ricin hydrogénée ont été testées comme traceurs éventuels de la graisse butyrique; l'examen général du problème soulevé par l'utilisation éventuelle de ces deux composés pour tracer les beurres de même que la description des tests et les conclusions qui en découlent ont été exposés dans les chapitres 1 A et 1 B.

I - A L'huile de ricin

1. Choix du traceur

Parmi les huiles végétales courantes, l'huile de ricin est peut-être celle qui contient le plus grand taux d'un acide pratiquement inconnu dans le beurre et dont la structure est à ce point différente de celle des autres acides gras qu'elle peut permettre une mise en évidence rapide et facile.

L'huile de ricin est caractérisée par sa haute teneur en acide ricinoléique ou 12 hydroxy 9 octadécénoïque, qui représente 85% des acides gras totaux de cette huile, tandis qu'on peut le considérer comme absent des beurres où on peut néanmoins trouver des traces d'une dizaine d'acides alcools saturés, le total de ces traces pouvant atteindre 0,4% des acides gras totaux (2).

En fait, l'huile de ricin a donc été pressentie comme traceur principalement pour ses caractères analytiques, mais il est clair que le problème biologique est susceptible de retenir d'abord l'attention.

1.1. Le problème biologique

Il semble étrange que l'on puisse envisager l'utilisation de l'huile de ricin comme traceur alors que cette huile est généralement connue pour ses propriétés laxatives et qu'on l'utilise comme cathartique en pharmacie. L'huile de ricin fut pourtant considérée jadis comme une huile alimentaire - les Chinois s'en servaient comme huile de friture et en Inde, on l'utilise de temps à autre pour falsifier l'huile d'arachide (3)

De petites doses d'huile de ricin dans un régime alimentaire normal ne sont pas laxatives (4) (5); en pharmacie, l'huile de ricin pour jouer son rôle de purgatif, doit être prise à jeun à des doses de plusieurs grammes. L'action purgative de l'huile de ricin serait due à l'accumulation d'acide ricinoléique dans l'estomac. Si l'acide ricinoléique est hydrogéné, le caractère laxatif disparaît et l'huile de ricin hydrogénée n'a pas d'action purgative (6).

L'huile de ricin hydrogénée et ses dérivés sont ainsi utilisés dans l'industrie alimentaire pour leurs qualités d'agents émulsifiants, d'agents épaississants et pour masquer le goût de vieux.

Des travaux scientifiques (3) ont établi que l'homme pouvait absorber l'huile de ricin et l'acide ricinoléique. Des expériences sur rats recevant un régime alimentaire contenant 48% d'huile de ricin pendant une durée de 25 à 40 jours ont montré que 2% seulement de l'acide ricinoléique absorbé était retrouvé dans les graisses de réserve (8). Celui-ci peut atteindre 7 à 10% maximum des acides gras dans les tissus adipeux, mais est absent des phospholipides (9) (10).

La croissance de rats nourris pendant 16 semaines avec un régime alimentaire contenant une fraction lipidique constituée par 20% d'huile de maïs n'est pas affectée si on remplace 1% d'huile de maïs par 1% d'huile de ricin hydrogénée.

Si on remplace 10% d'huile de maïs par 10% d'huile de ricin hydrogénée, la courbe de croissance reste identique jusqu'à 8 semaines, ensuite elle est légèrement plus basse pour les animaux nourris avec le régime contenant 10% d'huile de ricin hydrogénée (11). Dans ce cas, il semble que l'accroissement moindre du poids des animaux soit dû pratiquement exclusivement à la digestibilité moindre de l'acide ricinoléique hydrogéné par rapport à celle des acides gras ordinaires de l'huile de maïs plutôt qu'au caractère d'acide alcool de l'acide ricinoléique.

Le coefficient de digestibilité calculé sur divers acides gras et glycérides est en effet élevé pour les acides saturés inférieurs et l'acide oléique. Il est beaucoup plus faible pour les acides saturés supérieurs et l'acide ricinoléique.

Ainsi, selon Carroll (12), si le coefficient de digestibilité des acides inférieurs jusqu'à l'acide caprique (C10) est voisin de 100, il n'atteint que 39 pour l'acide palmitique, 23 pour l'acide stéarique et 7 pour l'acide béhénique; pour l'acide ricinoléique hydrogéné il est sans doute voisin de celui de l'acide stéarique. Si on considère les acides insaturés, le coefficient de digestibilité serait de 84 pour l'acide oléique et 51 pour l'acide érucique. Dans le cas de triglycérides, les rapports des coefficients de digestibilité sont sensiblement du même ordre.

Les acides hydroxylés apparaissent en faibles quantités dans de nombreux produits naturels. Citons principalement les pommes, les poires, les groseilles, le cassis et la gelée royale (5) (13) (14).

La matière grasse du lait peut contenir jusqu'à 0,4% au total de divers hydroxyacides saturés de 10 à 18 atomes de carbone, chaque acide n'étant présent que sous forme de traces (2).

De nombreux hydroxyacides sont produits normalement par voie microbienne dans le tractus intestinal de l'homme et les fèces en contiennent des quantités importantes (15) (16).

La dégradation de l'acide 12 hydroxystéarique conduit à des pertes successives par unités de deux carbones comme pour les autres acides gras (17). Il n'y a aucune preuve formelle de la transformation de l'acide 12 hydroxystéarique par déshydratation directe, en acide stéarique correspondant mais celui-ci disparaît très rapidement au profit d'unités plus petites auxquelles viennent se recombinaer des unités acétyl pour donner des acides

normaux, tels les acides palmitique, stéarique et oléique (17).

En conclusion, il est démontré qu'ajouté en faibles proportions au régime alimentaire, l'acide ricinoléique ou l'acide 12 hydroxystéarique ne pose pas de problème biologique. L'acide ricinoléique lui-même ne pourrait pas avoir un effet cathartique si on ajoutait dans la graisse de beurre une quantité inférieure à 5% d'huile de ricin.

1.2. Le problème économique

L'huile de ricin naturelle et l'huile hydrogénée pourraient être disponibles à des prix un peu supérieurs à ceux des principales huiles végétales. Il n'y a donc aucun problème économique conditionnant son utilisation éventuelle comme traceur dans le beurre.

1.3. Le problème analytique

Dans la graisse de lait on n'a ^{pas} pu mettre en évidence jusqu'à présent des traces d'acide 12 hydroxy 9 octadécénoïque alors que celui-ci représente 85% en moyenne des acides gras de l'huile de ricin.

Cependant la détermination par chromatographie gazeuse de l'acide ricinoléique dans la matière grasse du beurre n'est pas facile.

En effet, sur phase polaire, les esters méthyliques de l'acide ricinoléique sont fortement absorbés et les phases doivent être portées à leurs températures maximales d'utilisation; leur longévité est nécessairement fort diminuée.

Sur phase apolaire, les inconvénients liés à la dégradation thermique de la phase peuvent être évités; toutefois, dans ce cas, l'acide ricinoléique est insuffisamment séparé de certains acides à 20 atomes de carbone présents sous forme de traces dans les beurres.

Le contrôle de la pureté de l'huile de ricin, peut être réalisé cependant le plus facilement par le dosage de l'acide ricinoléique, grâce à la chromatographie des esters méthyliques des acides gras sur colonne apolaire.

2. Contrôle de l'huile de ricin

2.1. La composition en acides gras

L'huile de ricin vierge à usage pharmaceutique contient en moyenne 85% d'acide ricinoléique. Ce taux peut être légèrement variable, mais selon la littérature il ne semble pas qu'il descende en dessous de 80%.

En conséquence, l'huile de ricin utilisée comme traceur peut être contrôlée suivant le critère d'une teneur minimum de 80% d'acide ricinoléique.

Cette composition sera vérifiée par chromatographie sur colonne polaire ou sur colonne apolaire. Les esters méthyliques seront préparés par méthylation alcaline et non par méthanolyse acide qui provoquerait une déshydratation partielle de l'huile.

Sur colonne polaire (ex: 15% DEGS sur chrom. W 60-80) on obtient une bonne séparation des acides à 18 atomes de carbone saturés ou insaturés; cependant la température doit être poussée jusqu'à 220°C (fig. 1) - température où les phases polaires ne résistent pas longtemps; pour un contrôle plus rapide, on travaillera sur une colonne apolaire (ex: 5% SE52 sur Aeropak 30) qui supporte facilement ces températures. Les acides oléique et linoléique ne seront pas séparés, mais la détermination de l'acide ricinoléique lui-même peut être très précise.

Les huiles analysées et employées dans les essais de "marquage" décrits ci-après avaient les compositions en acides gras suivantes:

C16:	1,3 à 1,8%
C18:	0,8 à 1,2%
C18:1	4 à 6%
C18:2	5 à 7%
C18:3 + C18:2 conj	0,5 à 1%
C18 1 OH	83 à 88%
C18 2 OH	1%

2.2. La composition en glycérides

Du fait de la polarité du groupe hydroxy, les triglycérides de l'huile de ricin ont une polarité très différente des triglycérides ordinaires des corps gras. Cette propriété permet de les séparer très facilement de ceux-ci par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

Lorsqu'on utilise un solvant de développement usuel tel qu'un mélange d'éther de pétrole et d'éther éthylique, la triricinoléine qui constitue environ 70% des triglycérides de l'huile de ricin possède un R_f inférieur à celui des 1-2 diglycérides normaux des beurres et à celui des stérols et supérieur à celui des monoglycérides des acides habituels des graisses alimentaires.

Il y a plus de 20% de triglycérides contenant deux molécules d'acide ricinoléique et très peu de triglycérides ne contenant qu'un groupement acide ricinoléique, des traces (moins de 0,5%) de triglycérides d'acides gras ordinaires.

Achaya et col (18) sur la base de séparations des glycérides par chromatographie sur couche mince et d'analyses d'acides gras en chromatographie

Fig. 1: Chromatographie gazeuse des acides de l'huile de ricin
(esters méthyliques).

Col. DEGS 220°C

1:	C16	1,5%
2:	C18	1 %
3:	C18:1	5 %
4:	C18:2	6,4%
5:	C18:3 + C18:2	0,6%
6:	C18 1 OH	85,5%

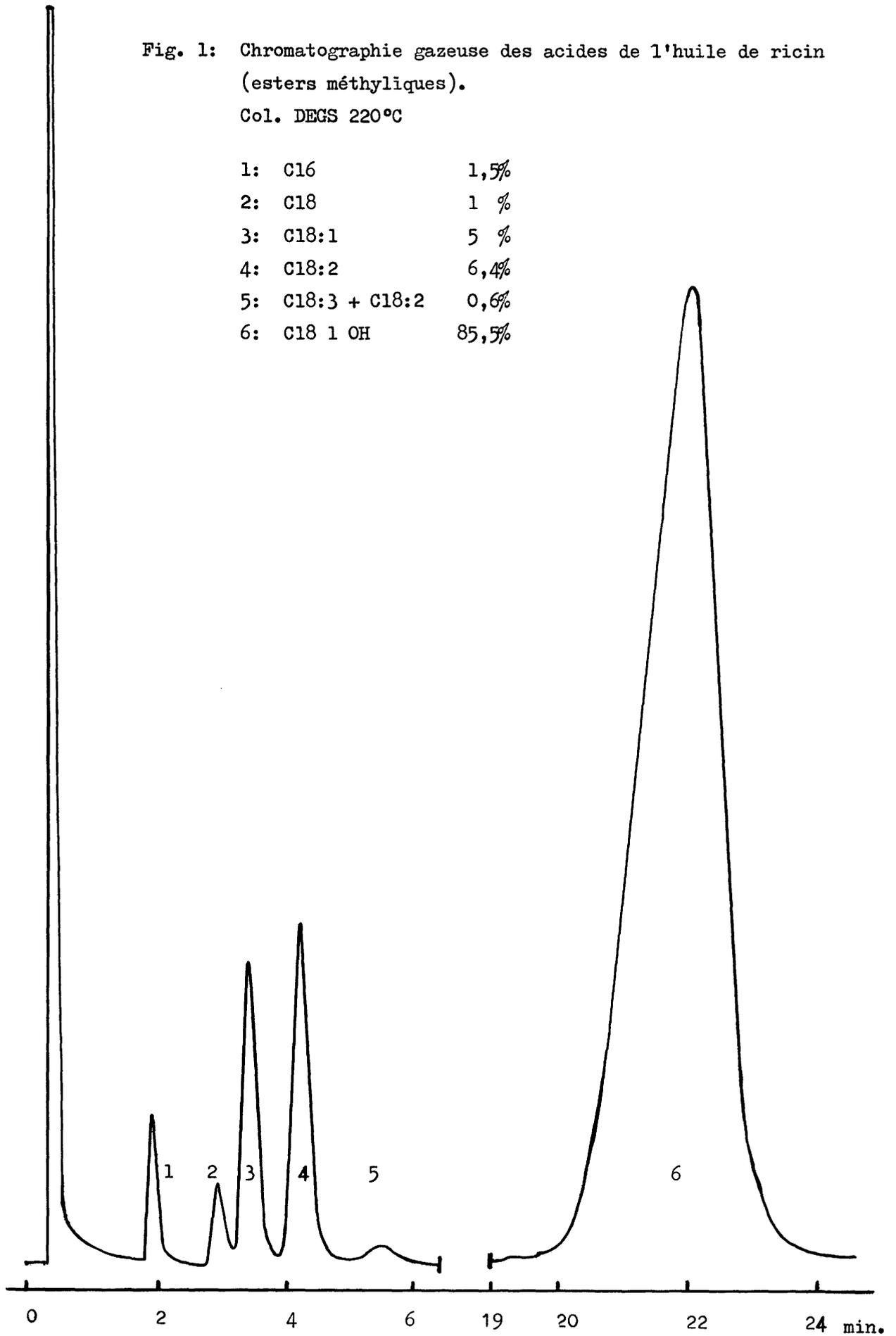
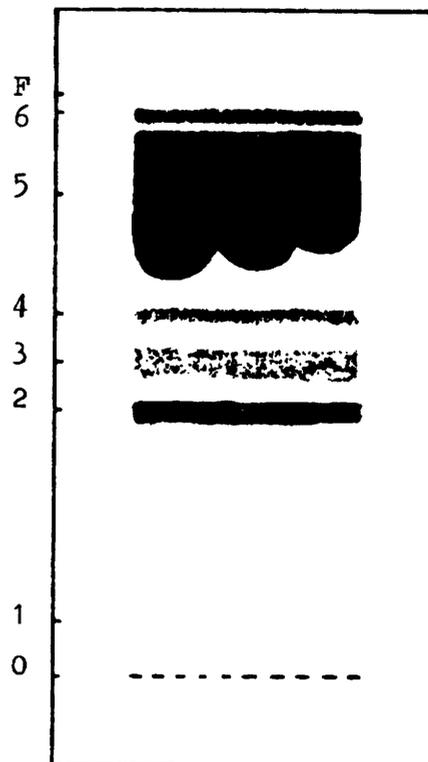
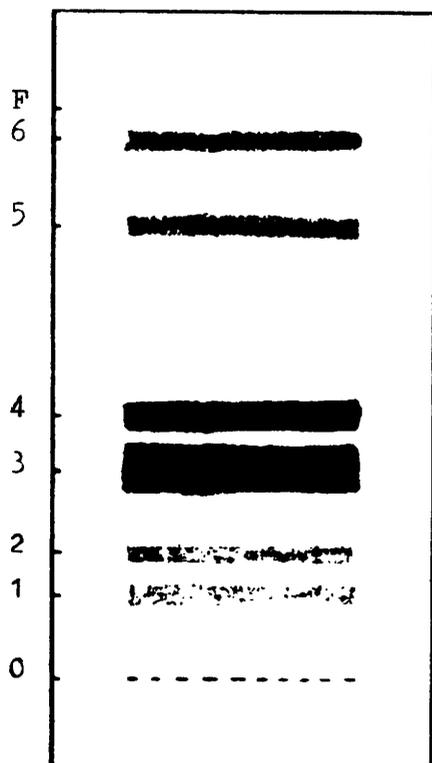


Fig. 2: C.c.m. sur gel de silice des glycérides de l'huile de ricin et du beurre
Ether de pétrole 60-80 Diéthyléther - H.Ac (50 -50-2)



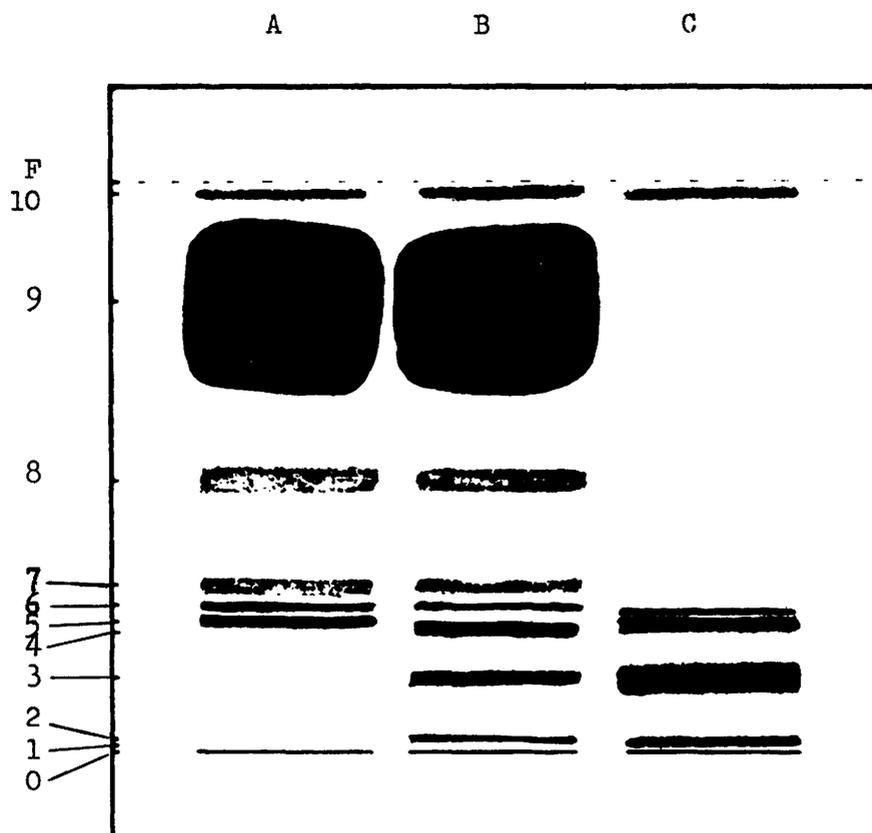
A. Huile de ricin: 2 microlitres

- 0 Origine
- 1 1-2 Diglyc. de l'ac. ricinoléique
- 2 1-3 Diglyc. de l'ac. ricinoléique (tr)
- 3 Triricinoléine
- 4 Diricino-oléine + stérols
- 5 Dialkyl ricinoléine + stérols
- 6 Stérides + triglycérides ordinaires (tr)
- F Front du solvant

B. Beurre normal: 20 microlitres

- 0 Origine
- 1 Monoglycérides (traces)
- 2 Diglyc. 1-2 + stérols
- 3 Diglyc. 1-3 (traces)
- 4 Acides libres
- 5 Triglycérides
- 6 Stérides et hydrocarbures
- F Front du solvant

Fig. 3: C.c.m. de gel de silice des glycérides des beurres et des beurres tracés
Eth de pétrole 60-80 Diéthyl éther - H.Ac (70 - 30 - 2)



- A. Beurre normal: 10 microlitres
- B. Beurre normal + 1% ricin: 10 microlitres
- C. Huile de ricin: 0,5 microlitre

- 0 Origine
- 1 Diricinoléine
- 2 Monoglycérides
- 3 Triricinoléine
- 4 Alkyldiricinoléine
- 5 1-2 Diglycérides
- 6 Cholestérol + phytostérois
- 7 1-3 Diglycérides
- 8 Acides gras
- 9 Triglycérides
- 10 Stérides + hydrocarbures
- F Front du solvant

gazeuse ont estimé la composition glycéridique de l'huile de ricin comme suit:

Triricinoléine:	68,2%	
Monoalkyldiricinoléine:	23,1%	{ 8,3% linoléodiricinoléine 7,5% oléodiricinoléine 7,3% d'autres diricinoléines
Dihydroxystéarodiricinoléine:	4,9%	(28% de diricinoléine totale)
Dialkylricinoléine:	moins de 4%	
Triglycérides ordinaires:	moins de 1%	

Cependant, sur la base de l'analyse des glycérides en chromatographie sur colonne, Pokorny (19) estime que la composition en triricinoléine de l'huile de ricin est un peu plus élevée et cite le taux de 77,6%. Il y aurait un pourcentage non négligeable de glycérides partiels.

De toute manière, une composition de l'ordre de 70% de triricinoléine et 25% d'alkyldiricinoléine telle que nous l'avons constatée est certainement très proche de la composition moyenne.

Les corps gras naturels étant constitués pour la partie principale par des triglycérides, il sera très facile de mettre en évidence des quantités aussi minimes que 1% d'huile de ricin dans une autre huile végétale ou animale (20).

Le schéma suivant illustre une méthode simple de séparation des glycérides de l'huile de ricin par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Fig. 2).

Conditions opératoires:

Plaque de gel de silice Merck F 254; 10 x 20 cm - 0,25 mm d'épaisseur

Développement: Ether de pétrole - oxyde d'éthyle - acide acétique
50 - 50 - 2

Le développement est arrêté à 15 cm de la ligne de départ

Prise d'essai: 2 microlitres d'huile de ricin

soit 200 microlitres d'l solution à 1% dans le chloroforme.

Révélateurs: 20% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol

Solution saturée de bichromate dans l'acide sulfurique concentré .

La plaque est déposée à l'étuve à 105°C., pendant 15 à 20 minutes.

La révélation par l'acide phosphomolybdique permet la mise en évidence aisée de 0,5 µl de triricinoléine séparés à partir de 10 microlitres d'un beurre contenant 1% de ricin.

En pratique on peut effectuer une dilution de 10% de beurre dans l'éther de pétrole et déposer 0,1 ml de la solution en spots ou en traits sur une ligne tracée à 2,5 cm de la base de la plaque.

Dans le cas d'une chromatographie en couche mince de gel de silice avec le développement par le solvant Ether de pétrole (60-80) Ether éthylique - Acide acétique 70 - 30 - 2, on a sensiblement les Rf suivants (Fig. 3)

Monoglycérides d'acides gras	0,04
Triricinoléine	0,13
1-2 Diglycérides	0,25
Stérols	0,30
1-3 Diglycérides	0,45
Triglycérides ordinaires	0,90

3. Choix du taux de traceur

Le taux d'huile de ricin admissible comme traceur dans le beurre étant inférieur à 5%, comme pour toutes les huiles alimentaires, l'analyse doit pouvoir mettre en évidence des proportions vingt fois moindres pour la détection de mélanges de beurres normaux et de beurres tracés.

En pratique il sera extrêmement difficile de déterminer avec une précision suffisante des taux voisins de 1% d'acide ricinoléique dans le beurre.

En conséquence, le choix de la dose de traceur ne sera pas fonction de la sensibilité que l'on peut obtenir par les méthodes de chromatographie gazeuse. Puisqu'il n'y a pas de triricinoléine dans le beurre, la chromatographie sur couche mince peut fournir ici un test de choix.

La sensibilité de ce test est en théorie illimitée; en pratique, seule la sensibilité des révélateurs utilisés et la charge de substances à séparer pour une épaisseur de couche donnée constitueront les facteurs limitatifs mais il existe de nombreuses possibilités d'agir sur la sensibilité du test de mise en évidence en modifiant les conditions de la chromatographie.

Pour une analyse de routine, il est cependant clair qu'on utilisera presque exclusivement des plaques normales avec des conditions normales de développement et de révélation.

Des essais ont donc été effectués sur plaques ordinaires de gel de silice type Merck F 254; 20 x 20 cm - 0,25 mm (Fig. 3).

Divers systèmes d'éluants ont été utilisés et il s'est avéré que le plus simple, si ce n'est le meilleur, peut consister en un mélange d'éther de pétrole et d'éther éthylique auquel on ajoute 1,5 à 2% d'acide acétique afin d'obtenir une migration meilleure des acides libres.

Si on utilise le mélange Ether de pétrole - Ether éthylique - Acide acétique 70 - 30 - 2, la triricinoléine migre sensiblement à mi-distance entre les monoglycérides éventuellement présents dans le beurre et les 1-2 diglycérides. Les plaques peuvent être révélées par une solution saturée de bichromate dans l'acide sulfurique et carbonisation à 180°C. ou plus simplement par la 2-7 dichlorofluorescéine (0,2% dans l'éthanol).

Le premier réactif a l'inconvénient d'une manipulation désagréable mais peut être utilisé pour des dosages approximatifs par densitométrie. Quant à la dichlorofluorescéine, elle ne permet pas d'obtenir une sensibilité aussi grande que l'acide phosphomolybdique.

La chromatographie sur couche mince permet donc rapidement et facilement la détection de triricinoléine dans la graisse de beurre.

La détection de 0,05% de triricinoléine dans le beurre ne poserait pas de problème et une sensibilité plus grande peut être obtenue sans grande difficulté avec un matériel simple.

Sur cette base, le "marquage" du beurre par 1 à 1,5% d'huile de ricin serait analytiquement efficace.

4. Contrôle des beurres tracés

La détermination de la triricinoléine dans un beurre "marqué" par addition de 1 ou 1,5% d'huile de ricin par chromatographie sur couche mince constitue un test et non une méthode d'analyse quantitative.

On ne voit pas comment on obtiendrait une méthode quantitative simple: la photodensitométrie des composés carbonisés n'est pas en pratique suffisamment reproductible et en tout cas ne saurait être précise pour des doses voisines de 1%.

L'extraction de la triricinoléine par grattage de la bande révélée à la 2-7 dichlorofluorescéine, suivie du dosage de la glycérine après saponification est une méthode bien trop longue et trop onéreuse pour être conduite dans un laboratoire de contrôle.

La chromatographie gazeuse sur colonne apolaire est imprécise en raison de la présence au temps de rétention de l'acide ricinoléique d'acides mineurs du beurre à 20 atomes de carbone.

Le contrôle le plus simple pourrait en réalité être effectué par référence, en chromatographie sur couche mince.

Si la dose de traceur dans le beurre est fixée à 1% d'huile de ricin, il est facile de réaliser un témoin constitué par du beurre additionné par 1% d'huile de ricin. Ce témoin est analysé en même temps qu'une série de beurres tracés à contrôler sur la même plaque de chromatographie en couche mince. Après révélation on compare par densitométrie l'intensité des spots de triricinoléine. Cette intensité doit être la même ($\pm 15\%$) pour le témoin et les beurres tracés. L'huile de ricin contient sensiblement le même taux de stérols totaux (0,29%) que la graisse de beurre mais ce sont des phytostérols (ca 63% de sitostérol, 25% de stigmastérol, 12% de campestérol).

L'analyse des stérols peut confirmer la présence de 1% d'huile de ricin dans la graisse de beurre.

5. Elimination de l'huile de ricin de la graisse de beurre

L'huile de ricin est soluble dans l'éthanol, mais on ne conçoit pas qu'on puisse l'enlever des lipides du "butter oil" ou sa solubilité est plus grande encore, par un tel solvant.

Elle est facilement et entièrement miscible à la graisse de beurre à des températures inférieures à 50°C et son incorporation au beurre comme traceur ne devrait pas poser de problème d'homogénéisation.

Les triglycérides de l'huile de ricin ne seront pas enlevés par la vapeur sous vide poussé à la température de 180 à 200°C.

Cependant, le chauffage de la graisse de beurre à haute température est susceptible de provoquer une redistribution partielle de l'acide ricinoléique au sein des triglycérides. La triricinoléine est en partie détruite et remplacée par des triglycérides ne contenant plus que deux ou une molécule d'acide ricinoléique.

Cette interestérisation partielle peut être constatée par chromatographie sur couche mince; elle réduit la sensibilité du test en diminuant la teneur en triricinoléine, cette diminution étant compensée par l'augmentation d'autres triglycérides moins facilement identifiables.

6. Conclusions

L'huile de ricin à la dose de 1% dans le beurre est facilement déterminable. Une telle dose permettrait le dépistage par un test simple, rapide et peu coûteux de moins de 5% de beurre tracé dans un beurre normal.

Le contrôle de l'huile de ricin peut se faire par chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides gras sur la base d'une teneur minimum de 80%

d'acide ricinoléique pour une huile normale.

Le test de la présence d'huile de ricin dans la graisse butyrique consiste dans la mise en évidence de triricinoléine par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Le contrôle peut être effectué par une technique chromatographique, par comparaison avec un témoin.

Un chauffage prolongé des beurres "marqués", en provoquant une réinterestérisation partielle, est susceptible d'abaisser quelque peu la sensibilité de ce test, sans pour autant compromettre sérieusement son efficacité.

I - B L'huile de ricin hydrogénée

L'huile de ricin hydrogénée est utilisée dans l'industrie des corps gras comme agent émulsifiant et comme agent épaississant. C'est un corps gras très dur à allure de cire, de point de fusion voisin de 87°C.

1. Choix du traceur

1.1. Le problème biologique

Les problèmes de nature biologique soulevés par l'utilisation de l'huile de ricin hydrogénée comme traceur de la graisse butyrique ont été posés pour l'huile de ricin normale et ils ont été étudiés au cours du chapitre précédent. Cependant les réticences dues à l'effet purgatif de l'huile de ricin normale ont disparu.

L'huile de ricin hydrogénée, du fait de la transformation de l'acide ricinoléique en acide 12 hydroxystéarique a perdu tout effet cathartique (4) (5).

Cependant, l'acide 12 hydroxystéarique est moins digestible que l'acide ricinoléique, mais ce fait a des incidences négligeables si le taux d'acide hydroxystéarique du régime alimentaire est de l'ordre de 1%. Rappelons ici que la consommation par des rats de 1% d'huile de ricin hydrogénée dans un régime dont la fraction lipidique était composée de cette huile plus 19% d'une huile de maïs, n'entraîne jamais, même après plusieurs mois, une diminution de croissance, par rapport à un régime témoin contenant 20% d'huile de maïs. Si le taux d'huile de ricin hydrogénée est porté à 10% et le taux d'huile de maïs réduit d'une proportion semblable à 10%, un retard de croissance, dû à la digestibilité moindre de l'acide 12 hydroxystéarique s'observe après 8 semaines et s'amplifie légèrement par la suite (11).

A une dose voisine de 1%, la présence d'huile de ricin hydrogénée dans un beurre ne saurait donc poser de réticences d'ordre biologique.

1.2. Le problème économique

Le problème économique est lui aussi semblable à celui posé par l'utilisation de l'huile de ricin normale. Le prix de l'huile de ricin hydrogénée, un peu plus élevé que celui de l'huile de ricin ordinaire, restera de toute manière beaucoup inférieur à celui pratiqué pour la matière grasse butyrique dans les pays européens.

1.3. Le problème analytique

Du point de vue analytique, les méthodes de détermination de l'acide 12 hydroxystéarique et de l'acide ricinoléique sont les mêmes (voir chapitre 2.2.I.A.)

Du fait de son point de fusion élevé, la manipulation de l'acide 12 hydroxystéarique est en pratique moins aisée que celle de l'acide ricinoléique.

2. Contrôle de l'huile de ricin hydrogénée

L'huile de ricin hydrogénée comme l'huile de ricin naturelle peut être contrôlée par chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides gras sur une colonne polaire ou apolaire, avec une préférence en analyse courante pour la deuxième technique. Le taux minimum d'acide 12 hydroxystéarique devra être de 80%. La composition glycéridique sera examinée par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

L'huile de ricin hydrogénée du commerce qui a été utilisée pour les essais de "marquage" a été analysée suivant ces deux techniques.

2.1. Composition des acides gras

Cette composition a été déterminée par chromatographie gazeuse des esters méthyliques selon les modalités analytiques décrites ci-dessous.

Instrument: Aerograph 1520

Colonne: Acier inox - longueur 2 m; diamètre 3 mm

Phase: 5% S E 52

Support: Aeropak 30 - 100 - 120

Température: progr. 170 à 270°C.

Détecteur: F I D

Tempér. 300°C.

Injecteur: Tempér. 300°C.

Gaz vecteur: Azote: 35 ml/min.

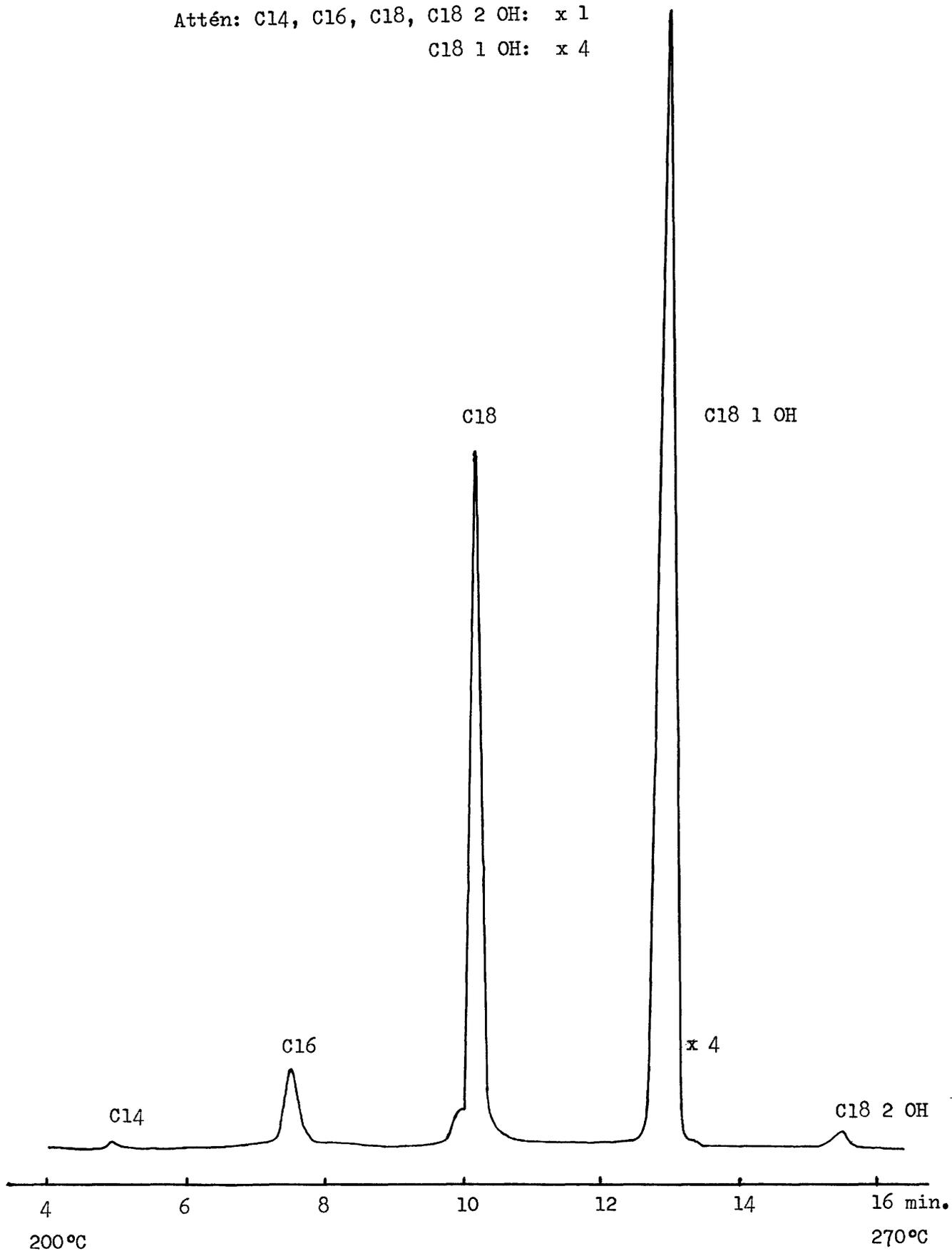
Enregistreur: Sargent: 1 m.v.

Fig. 4: Chromatographie gazeuse des acides gras de l'huile de ricin hydrogénée (esters méthyliques).

Col. ac. inox 2 m x 3 mm 5% SE 52 sur Aeropak 30-100-120

Attén: C14, C16, C18, C18 2 OH: x 1

C18 1 OH: x 4



Composition:	Acide myristique	C14	0,1%
	Acide palmitique	C16	1,1%
	Acide stéarique	C18	10,7%
	Acide oléique + isomères	C18:1	0,6%
	Acide 12 hydroxystéarique	C18 1 OH	87,0%
	Acide dihydroxystéarique	C18 2 OH	0,5%

2.2. Composition des glycérides

Elle peut être estimée après chromatographie sur couche mince de silice, révélation par carbonisation et densitométrie.

L'huile de ricin hydrogénée comprend presque exclusivement deux types de triglycérides: la trihydroxystéarine et la stéarodihydroxystéarine, le premier type étant trois à quatre fois plus représenté que le second. Les diglycérides sont en quantité très faible et le taux des monoglycérides se réduit à des traces. La composition glycéridique est sensiblement la même que celle obtenue pour l'huile de ricin, mise à part l'hydrogénation des acides insaturés (voir chapitre 2.2.I.2.).

3. Choix du taux de traceur

Comme pour l'huile de ricin ordinaire, on peut fixer le taux du "marquage" à 1 ou 1,5% d'huile de ricin hydrogénée dans le beurre, avec les mêmes garanties d'efficacité pour la détermination de l'acide 12 hydroxystéarique ou de la trihydroxystéarine qui avaient été obtenues pour l'acide ricinoléique et la trihydroxyricinoléine.

4. Contrôle des beurres tracés

4.1. Méthodes analytiques

Ces méthodes sont celles signalées pour l'huile de ricin normale (chapitre 2.2.I.A.). On contrôlera la présence d'huile de ricin hydrogénée dans les beurres tracés par la mise en évidence de la trihydroxystéarine. Ce contrôle peut être effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice. On réalise ainsi un test simple de mise en évidence du traceur. Toutefois, la sensibilité de la révélation par l'acide phosphomolibdique est un peu plus faible pour l'huile de ricin hydrogénée que pour l'huile de ricin normale. Il n'y a pas de méthode simple et précise permettant le dosage de l'acide 12 hydroxystéarique en quantité voisine de 1% dans le beurre, mais on peut effectuer des tests comparatifs.

4.2. Observations empiriques

L'huile de ricin hydrogénée ayant un point de fusion voisin de 87°C, elle pose des problèmes de solubilité dans la matière grasse du beurre.

Le traceur qui peut se présenter sous forme de paillettes ou de poudre granulée devrait être dissous à une température de 90°C dans un prémélange à 30% environ d'huile hydrogénée dans la graisse de beurre. Une dilution définitive pourrait être effectuée à température moins élevée à partir du mélange concentré. Même si on dispose de poudre très fine, dans le cas du beurre, il serait très difficile d'obtenir des mélanges homogènes par simple malaxage à température ordinaire; aussi l'utilisation éventuelle de l'huile de ricin hydrogénée devrait être réservée à la graisse de beurre fondue et non au beurre lui-même.

A la dose de 1% dans la graisse butyrique, l'huile de ricin hydrogénée joue le rôle d'un agent épaississant et le "butter oil" tracé de cette manière se distingue généralement des "butter oils" purs par une clarification difficile et incomplète à 50 et même à 60°C. Cette absence de limpidité constitue un indice très simple et observable rapidement qui permettrait de distinguer les graisses tracées et les graisses normales.

5. Elimination de l'huile de ricin hydrogénée de la graisse de beurre

L'huile de ricin hydrogénée et en particulier l'acide 12 hydroxystéarique peuvent difficilement être enlevés des beurres par des procédés économiques.

Comme pour l'huile de ricin, l'élévation de la température est toutefois susceptible de provoquer un réarrangement moléculaire au sein des glycérides, réarrangement qui pourrait faire décroître fortement les proportions de trihydroxystéarine des beurres tracés. Cependant l'acide hydroxystéarique lui-même ne sera pas éliminé par des procédés de désodorisation sous vide par la vapeur.

Les propriétés physiques de l'huile de ricin hydrogénée incitent plutôt à penser qu'on pourrait peut-être se baser sur des méthodes industrielles de cristallisation fractionnée pour séparer celle-ci de l'huile de beurre. L'huile de ricin hydrogénée devrait probablement être enlevée le plus simplement par des procédés de frigidation et de fractionnement physique analogues à ceux qu'on emploie parfois dans le raffinage des huiles, pour l'élimination des cires.

Les techniques de cristallisation fractionnée employées couramment dans l'industrie des huiles alimentaires ne paraissent pas encore être utilisées pour la graisse de beurre, autrement que de manière expérimentale. Cependant, des développements industriels peuvent être attendus et il est nécessaire d'en tenir compte.

6. Conclusions

Sur le plan biologique, l'utilisation de 1 à 1,5% d'huile de ricin hydrogénée comme traceur de la graisse butyrique ne présente absolument aucun inconvénient et, psychologiquement, la disparition de tout effet cathartique de l'huile pure en ferait un traceur plus aisément accepté que l'huile de ricin normale.

Sur les plans économique et analytique, l'huile de ricin ordinaire et l'huile de ricin hydrogénée présentent sensiblement les mêmes avantages et les mêmes inconvénients.

Les avantages sont essentiellement la possibilité d'un contrôle rapide, effectué en séries par chromatographie sur couche mince des glycérides pour les deux types de traceurs et les indications immédiates données par l'observation de la fusion à 50°C de la graisse tracée par 1% d'huile de ricin hydrogénée.

Les inconvénients résident dans la difficulté d'un contrôle précis du "marquage" et des beurres "marqués", le réarrangement possible des glycérides (diminution de la trihydroxystéarine ou de la triricinoléine) par les traitements thermiques effectués dans l'industrie pour les deux types de traceurs et les possibilités d'élimination partielle de la trihydroxystéarine par la cristallisation fractionnée.

Cependant, l'utilisation de l'huile de ricin hydrogénée comme traceur de la matière grasse butyrique est susceptible de présenter un inconvénient majeur par rapport à l'utilisation de l'huile de ricin normale. Cet inconvénient réside dans sa très grande dureté reflétée par le point de fusion de 87°C. Cette grande dureté rend très difficile l'homogénéisation des mélanges de graisse butyrique et d'huile de ricin hydrogénée, sans forte élévation de la température, souvent indésirable.

En conséquence, l'huile de ricin hydrogénée pourrait être davantage un traceur des "butter oils" plutôt qu'un traceur des beurres. Si son utilisation en tant que tel devait être envisagée, il serait nécessaire de régler au préalable les conditions du "marquage" afin de garantir l'homogénéisation des produits "marqués".

Par son caractère d'agent épaississant, l'huile de ricin hydrogénée rend trouble à la vue la graisse butyrique fondue à 50°C, si son taux de dispersion dans celle-ci atteint seulement 1%. Par ce caractère, le "marquage" de la matière grasse butyrique par 1% d'huile de ricin hydrogénée offre des possibilités de détection quasi immédiate.

D'autre part, l'huile de ricin naturelle et l'huile de ricin hydrogénée peuvent être décelées fort simplement par un test utilisant la chromatographie sur couche mince; ce test très rapide présente une sensibilité suffisante pour les besoins du "marquage", si la dose de traceur est de 1% du poids de la graisse butyrique.

2 - 2 - I Bibliographie

1. Guyot A.; Informations internes sur l'Agriculture - Com. des Com. Européennes 74 - mai 1971
2. Keeney M., Katz I. and Schwartz D.P.; Biochim. et Biophys. Acta, 72: 615 1962
3. Sollman T.; Manual of Pharmacology - 8th Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia - 1957
4. Wattson W., Gordon R., Karmen A. and Jover A.; J. Pharm. Pharmacol. 15: 183 - 1963
5. Eglinton G. and Hunneman D.; Phytochemistry 7: 313 - 1968
6. Masri M., Goldblatt L., de Eds F. and Kohler G.; J. Pharm. Sciences 51: 999 - 1962
7. Perkins E., Endres F. and Kunnerow F.; J. Nutr. 78: 291 - 1961
8. Stewart W.W. and Sinclair R.C.; Arch. Biochem. Biophys. 8: 7 - 11 - 1945
9. Watson W.C. and Gordon R.S.; J. Biochem. Pharmacol. 11: 229 - 1962
10. Watson W.C. and Murray E.S.; Biochim. et Biophys. Acta 106: 311 - 1965
11. Binder R.C., Booth A.N., Robbins D.J. and Fuller G.; Lipids 5: 832 - 1970
12. Carroll K.K.; Nature 191: 377 - 1961
13. Dimick P.S., Patton S., Kinsella J.E. and Walker N.J.; Lipids 1: 387 - 1966
14. Weaver N., Johnstoon N.C., Benjanen R. and Law J.H.; Lipids 3: 535 - 1968
15. James A.T., Webb J.P. and Kellock T.D.; Biochem. J. 78: 333 - 1961
16. Rosenfeld R.S., Hellman L.; Arch. Biochem. Biophys. 97: 406 - 1962
17. Elovson J.; Biochim^{et} Biophys. Acta 84: 275 - 1964
18. Achaya K.T., Craig B.M. and Youngs C.G.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 41: 783 - 1964
19. Pokorny J., Hladik J. and Zeman I.; Pharmazie 23: 332 - 1968
20. Lakshminarayana G. and Mani V.; Indian J. Technol. 2: 320 - 1964.

II. LES TRIGLYCERIDES PREPARES INDUSTRIELLEMENT

Choix du traceur

Il ressort d'une étude récente (1), publiée dans le cadre des informations internes sur l'agriculture par la Commission des Communautés Européennes, que la recherche de traceurs efficaces de la matière grasse butyrique pouvait être avantageusement orientée vers les triglycérides d'acides impairs préparés par l'industrie.

Il est bien connu que, parmi les glycérides du beurre, ceux qui contiennent des acides impairs inférieurs sont excessivement peu représentés. En effet, les acides gras impairs inférieurs ne se trouvent qu'à l'état de traces dans le beurre et les premières estimations sérieuses de ces traces datent du développement des méthodes de chromatographie gazeuse.

James et Martin (2) signalent la présence dans la graisse de lait d'environ 0,01% d'acides saturés à 5 atomes de carbone (C5), de 0,02% d'acides saturés à 7 atomes de carbone (C7) et de 0,03% d'acides saturés à 9 atomes de carbone (C9). Les proportions des acides pairs sont, comme on le sait, beaucoup plus considérables.

Le tableau suivant, extrait d'une revue sur les acides gras du lait de R.G. Jensen et col. (3), illustre la composition de la matière grasse du lait de vaches en acides saturés à chaîne droite.

Acides saturés de la graisse butyrique (3)

Acide	Taux %	Réf.	Acide	Taux %	Réf.
2:0	0,09	4	16:0	25,24	2
4:0	3,57	4	17:0	0,70	5
5:0	0,04	2	18:0	11,90	2
6:0	2,22	2	19:0	0,05	6
7:0	0,02	2	20:0	0,02	4
8:0	1,06	2	21:0	0,04	6
9:0	0,03	2	22:0	0,04	6
10:0	1,88	2	23:0	0,01	6
11:0	0,12	5	24:0	0,02	6
12:0	2,96	2	25:0	0,01	7
13:0	0,10	2	26:0	0,02	6
14:0	11,20	2	27:0	tr	8
15:0	1,52	5	28:0	tr	8

Cependant, les valeurs citées sur ce tableau ne représentent qu'une composition plus ou moins moyenne, car les acides gras de la graisse du lait varient dans de larges limites, en fonction principalement du régime alimentaire: toutefois, les variations les plus importantes ne concernent pas les acides à nombre d'atomes de carbone inférieur à 10, du fait que ceux-ci ne se rencontrent pas ou ne se rencontrent qu'à l'état de traces dans l'alimentation normale des vaches laitières et qu'ils trouvent donc leur origine dans des processus de synthèse au sein de l'organisme.

L'acide énanthique (C7), toujours à l'état de traces dans le beurre, a l'avantage d'être déterminé par chromatographie plus aisément que l'acide valérique (C5), en quantité tout aussi négligeable, et il semble pouvoir être obtenu commercialement plus aisément que les autres acides inférieurs.

1.1. Le problème biologique

L'utilisation, comme traceurs de la graisse butyrique, de triglycérides des acides impairs peut-elle susciter des appréhensions de nature biologique?

En fait, cette question peut être scindée en deux parties.

Premièrement, les acides impairs sont-ils utilisés biologiquement par l'organisme animal de la même manière que les acides pairs?

Deuxièmement, l'innocuité des acides impairs et de leurs triglycérides est-elle totalement prouvée?

a) Utilisation biologique des acides impairs

En ce qui concerne l'utilisation biologique des acides impairs, la réponse est indiscutable et précise.

Les acides gras impairs au même titre que les acides gras pairs sont parfaitement utilisés par les organismes animaux. Tous les ouvrages traitant du métabolisme des acides gras en témoignent. Citons particulièrement les ouvrages de K. Lang (9) et de K.S. Markley (10).

La seule différence existant entre le métabolisme des acides gras pairs et celui des acides gras impairs peut être résumée par les observations suivantes: les acides pairs par dégradation oxydative (bêta oxydation), contrôlée enzymatiquement, donnent lieu à la formation de n (Acétyl CoA) tandis que les acides impairs, par des processus similaires, donnent lieu à la formation de n (Acétyl CoA) + 1 (Propionyl CoA).

Le métabolisme de l'acide propionique est aujourd'hui bien expliqué.

L'appareil enzymatique chez les organismes microbiens et les mammifères transforme l'unité Propionyl CoA en Succinyl CoA, par une suite de trois opérations successives, suivant le schéma ci-dessous:



L'acide succinique faisant partie du cycle de Krebs, il intervient ensuite une dégradation oxydative comme celle qui se passe au sein de ce cycle.

Le stade ultime de la dégradation est la formation de CO₂ et de H₂O, comme avec l'acide acétique.

De nombreuses publications font état du métabolisme des acides impairs dans l'organisme, celui-ci se ramenant toujours à celui de l'acide propionique (13) (14) (15) (16) (17). Ce dernier est pratiquement complètement éclairci et les principaux enzymes ou systèmes enzymatiques ont été isolés et purifiés (18) (19) (20).

L'obtention de l'acide propionique à partir des acides impairs et le métabolisme de celui-ci sont des faits scientifiquement prouvés et ils sont actuellement admis dans tout le monde scientifique. Il en résulte donc que l'utilisation des acides impairs ne pose pas de problème biologique.

b) Innocuité des acides impairs

L'utilisation biologique apparemment normale d'un produit n'est pas nécessairement une preuve de son innocuité. Le plus souvent celle-ci n'est admise qu'à la suite d'essais toxicologiques. On peut croire cependant que dans le cas des glycérides d'acides impairs, de tels essais ne seront pas nécessaires.

En effet, il est aujourd'hui établi que les acides impairs ne sont pas si rares dans la nature qu'on l'avait estimé il y a une vingtaine d'années et ils sont parfois consommés par des groupes humains en quantités relativement importantes, sans que l'on ait jamais remarqué quelque effet biologique néfaste. Dans la graisse du lait, leur taux atteint de 2 à 3%, uniquement pour les acides à chaîne normale et, si on ajoute les acides à chaîne ramifiée, ce taux peut atteindre 4% (3). Il en va de même pour la graisse de boeuf et les graisses de réserve de ruminants en général (21).

Dans la graisse de péritoine de mouton, J. Flanzly et col (22) ont trouvé jusqu'à 6,5% d'acides impairs en C₁₅ et C₁₇. Ce sont pourtant les graisses d'animaux marins et les huiles de poisson qui contiennent en général les doses les plus élevées d'acides impairs.

La graisse de dauphin et la graisse de marsouin se distinguent par leur teneur élevée d'acide isovalérique (jusqu'à 25%) (23). En général, les huiles de poisson contiennent environ 2% d'acides impairs (24), mais on connaît des exceptions remarquables. Chez le mulot, on peut trouver de 10 à 25% d'acides

impairs suivant l'endroit et la saison où s'est effectuée la prise (25). Des quantités similaires ont été mises en évidence chez l'éperlan pêché sur les côtes de Nouvelle Ecosse (26).

Depuis toujours, l'homme consomme donc des acides impairs, sans qu'il en résulte apparemment le moindre préjudice.

Sans doute, en général, cette consommation est -elle très limitée; cependant, la plupart des huiles marines sont considérées comme huiles alimentaires. Un homme consommant quotidiennement 25 gr de beurre "marqué" par 2% de triglycérides d'acides impairs n'absorbera au total pas plus d'acides impairs que celui qui consommera dans le même temps 50 gr de beurre non "marqué" ou 50 gr de graisse de boeuf et bien moins que celui qui consommera 25 gr par jour de margarine à base de quelques huiles marines hydrogénées. Or, on le verra plus loin, le "marquage" du beurre, requièrera pour être analytiquement efficace, l'addition de moins de 2% de triglycérides d'acides impairs; en conséquence, des essais toxicologiques ne nous paraissent aucunement nécessaires.

Certains objecteront peut-être, qu'en réalité, ce sont non des acides impairs qui sont directement consommés, mais des triglycérides d'un acide impair unique, produits éminemment peu naturels, puisque la nature ne favorise guère la synthèse des triglycérides d'un acide gras unique. Cette assertion est exacte, mais si la nature ne favorise pas la synthèse de triglycérides d'un seul acide gras, c'est avant toute autre chose, en raison du choix fort large en acides gras dont elle dispose généralement; si ce choix est réduit (ricin, amande), il existe des quantités importantes de certains triglycérides d'acides uniques.

De toute manière, l'action des lipases du système digestif animal a pour résultat de scinder les molécules de triglycérides en unités plus petites, glycérol, acides gras, mono et diglycérides, qui seront absorbées ultérieurement de la même manière au niveau de l'intestin, quelle que soit la forme de triglycéride originel.

1.2. Le problème économique

Les traceurs choisis doivent pouvoir rendre le "marquage" du "butter oil" économiquement acceptable; leur prix ne doit donc pas être exorbitant, eu égard à la dose utilisée et, dans le cas où ceux-ci seraient des triglycérides, il est même souhaitable que le prix fixé ne puisse être de beaucoup inférieur au prix de la graisse butyrique, afin d'éviter, en rendant anti-économique, toute utilisation excessive.

En ce qui concerne les triglycérides de l'acide énanthique, il semble bien qu'il en sera ainsi.

L'isolement des composés en C7 à partir de la décomposition thermique de produits naturels, la synthèse et la purification des triglycérides de l'acide énanthique sont des opérations à la mesure de l'industrie moderne des corps gras; le produit obtenu pourrait avoir un prix de revient inférieur à celui pratiqué pour le beurre dans la CEE et nous avons reçu une offre d'une firme allemande faisant état de prix variant entre 1,62 et 1,80 U.C. par kg, suivant la quantité demandée.

1.3. Le problème analytique

Ce chapitre fera uniquement mention de tests et d'essais réalisés à partir de triglycérides de l'acide énanthique, car il s'avère que ce sont les premiers parmi les triglycérides d'acides impairs dont on pourrait envisager une livraison commerciale rapide.

Remarquons ici que les problèmes analytiques posés par la dénaturation des beurres par les triglycérides d'acides impairs inférieurs ne sont guère différents les uns des autres, pourvu que les acides utilisés restent présents dans les beurres à des taux semblables, ce qui est le cas des acides valérique et pélargonique par exemple.

1.3.1. Méthode analytique et fondements de la méthode de contrôle

La mise en évidence dans le beurre du traceur constitué par des triglycérides de l'acide énanthique peut être effectuée simplement et rapidement en chromatographie gazeuse.

Pour des raisons de facilités analytiques, ce sont les acides gras qui seront déterminés sous forme d'esters méthyliques et non les triglycérides eux-mêmes. En chromatographie gazeuse ordinaire, sur colonnes polaires ou non polaires longues de deux à trois mètres et de quelques millimètres de diamètres, avec détecteur à ionisation de flamme, il est relativement facile de mettre en évidence 0,05% d'un acide gras inférieur quelconque dans une matière grasse.

Par exemple, il sera possible de déterminer dans le beurre toute addition d'environ 0,05% de l'un ou l'autre des acides C5, C7 ou C9 dont la teneur n'atteint jamais 0,05% des acides gras de la graisse butyrique.

Par contre, le taux des acides C11 et C13 dans le beurre étant de l'ordre de 0,1%, la détermination de l'addition de quantités de l'ordre de 0,05% de C11 ou C13 devient beaucoup plus difficile, voire aléatoire.

Sur colonne polaire d'ailleurs, l'acide C11 peut être mal séparé de l'acide C10:1, l'acide C13 et les acides supérieurs impairs confondus avec des acides non saturés ou ramifiés; cette difficulté analytique rend certainement l'utilisation de leurs triglycérides comme traceurs, peu souhaitable

en comparaison de l'utilisation des triglycérides des acides C5, C7 et C9. Si, comme nous l'avons constaté empiriquement et comme le confirme la littérature, dans la graisse butyrique, le taux naturel de C9 est supérieur à celui de C7, lui-même supérieur à celui de C5, soit $C9 > C7 > C5$, le meilleur traceur serait l'acide valérique C5, ensuite l'acide énanthique C7 et enfin l'acide pélargonique C9.

Cependant, des quantités aussi faibles que 0,05% d'un acide gras quelconque doivent être calculées par rapport à un étalon interne ou par rapport à un acide gras du beurre remplissant cette fonction, par exemple l'acide caproïque C6 ou l'acide caprylique C8.

On a intérêt à se servir de l'acide caprylique car il est moins volatil et sa teneur, environ deux fois moins importante que celle de l'acide caproïque, est plus directement comparable à celle des acides impairs inférieurs et davantage à l'acide C7 qu'à l'acide C5.

D'autre part, l'addition de triglycérides de l'acide C7 au beurre inverse le rapport C7/C9 des acides gras de celui-ci. Ceci constitue un test très simple de la présence du traceur.

Dès que C7/C9 dans une graisse butyrique est supérieur à 1, on peut être certain qu'il y a eu un apport anormal d'acide énanthique.

L'observation du rapport C7/C9 permettra de déceler, en principe, des traces de 0,01 à 0,03% de triglycérides de l'acide énanthique additionnés en tant que traceur dans le beurre.

1.3.2. Les triglycérides de l'acide énanthique (n heptanoïque)

a) Propriétés générales

Des triglycérides de l'acide n heptanoïque nous ont été fournis par une firme allemande. L'acide heptanoïque est produit à partir de processus de "cracking". L'huile de ricin semble constituer la matière première principale. La synthèse du triglycéride utilise un catalyseur qui est un ester de titane. Le catalyseur est complètement éliminé par le raffinage et ne peut plus être mis en évidence par voie chimique directe.

Selon les indications données par la firme productrice, la pureté en acide énanthique (C7) serait d'environ 98% et une pureté supérieure à 95% peut être garantie.

Ces triglycérides sont fluides à température ordinaire et même à 0°C. C'est une huile inodore légèrement jaunâtre parfaitement miscible au "butter oil".

L'indice d'acidité est de l'ordre de 0,11, soit plus de 5 fois inférieur à celui d'un beurre ordinaire. L'indice de saponification est de l'or-

dre de 388 à 390.

La chromatographie en couche mince et sur colonne de silice ont permis d'établir la présence de 11 à 12% de diglycérides (1-2 et 1-3 diglycérides), mais il n'y a pratiquement pas de monoglycérides (moins de 0,1%). Il y a environ 88% de triglycérides.

Une analyse des esters méthyliques des acides gras a été effectuée sur colonne apolaire, ensuite sur colonne polaire.

Les esters méthyliques ayant été préparés en ampoule scellée par méthanolyse, ceux-ci peuvent être accompagnés d'autres substances solubles dans les graisses.

Les résultats globaux sont les suivants:

C6	:	Ca 0,7%
Indéterminés	:	(dont C16, C18, C18:1, C18:2, C14, C12 sous forme de traces) Ca 3%
C7	:	96 à 97% du total (Ca 98% des acides gras).

Les produits indéterminés paraissent être des produits relativement polaires formés au cours de réactions organiques.

En tout état de cause, la pureté de ces triglycérides est extrêmement grande et tout à fait satisfaisante pour la dénaturation des beurres. Pratiquement, lors des analyses courantes des esters méthyliques des acides gras, on pourra négliger les impuretés et on considérera que le produit est pur en acide heptanoïque. En effet les glycérides, au sein du beurre, ne constituent en moyenne que 99% de la graisse totale; d'autre part, lors de la détermination usuelle des acides gras d'un beurre, on néglige généralement les acides supérieurs à plus de 18 atomes et certains acides sous forme de traces compris entre C4 et C18, de telle sorte qu'en général on ne tient compte que d'environ 95 à 98% des corps volatils séparés sur les colonnes.

b) Contrôle du traceur

Puisqu'il semble très facile à l'industrie chimique de préparer des triglycérides de l'acide énanthique pratiquement purs, nous estimons qu'on peut fixer la pureté exigée pour ce traceur à 95% d'acide heptanoïque au minimum, non seulement parmi les acides gras, mais aussi parmi l'ensemble des substances volatiles éluées sur une colonne apolaire à 250°C.

On procédera de la manière suivante:

Les esters méthyliques des acides gras sont préparés par méthanolyse en ampoule scellée. Le produit de la méthanolyse est injecté en vue de l'analyse, sur une colonne apolaire (Ex: 4% SE 52) et on évalue les proportions respectives de C7 et des autres substances. Le taux

d'acide C7 doit être supérieur à 95% du total des substances éluées à 250°C.

La somme de l'acide C6 et des autres substances volatiles doit être inférieure à 5% de l'ensemble des substances éluées à 250°C.

Si les triglycérides répondent à ces critères, on pourra en pratique les considérer comme purs en acide heptanoïque, lorsqu'on évaluera leur proportion respective dans les beurres dénaturés.

1.3.3. Choix du taux de traceur

Le taux de triglycérides de l'acide heptanoïque qu'on choisira en vue du "marquage" des beurres sera fonction de l'efficacité voulue pour ce "marquage".

Un traceur efficace devra être facilement mis en évidence, dans tous les cas, lorsqu'il se trouve à une dose de 5% de la dose préconisée pour le "marquage". Ainsi, si la dose préconisée pour le "marquage" est de 1%, on doit facilement pouvoir mettre en évidence 5% de beurre tracé dans un beurre normal, donc en fait, on devra pouvoir déceler une addition de 0,05% d'acide heptanoïque dans un beurre normal.

Ceci sera parfaitement possible et les techniques exposées au chapitre suivant seront aisées à appliquer.

Pour le contrôle rapide de l'exactitude de la dose qui a été additionnée en tant que traceur, on effectuera le rapport C7/C8.

Dans la matière grasse butyrique, le taux de C8 est en moyenne de 1,1 à 1,2% et les références de la littérature indiquent qu'il n'atteint pratiquement jamais 2%.

En conséquence, nous préconisons comme dose de traceur, 1,2% soit 12 kg de triglycérides de l'acide heptanoïque par tonne de graisse butyrique plutôt que 1% ou 10 kg par tonne.

Ainsi, le taux de C7 d'un beurre tracé sera en moyenne identique ou légèrement supérieur au taux de C8 et, dans tous les cas, il sera au minimum de 60% du taux de C8 ($C7/C8$ minimum = 0,6) et, au maximum, si on considère un taux minimum de C8 dans le beurre naturel de 0,7 à 0,8% de 160% du taux de C8 ($C7/C8$ maximum = 1,6).

Dans un beurre tracé par 1,2% de triglycérides d'acide heptanoïque, on aura toujours $0,6 < C7/C8 < 1,6$.

Un tel contrôle, comme il ne concerne que les acides inférieurs relativement volatils sera extrêmement simple, rapide et économique. Il ne permettra aux industriels qui seront chargés de la dénaturation des beurres que de jouer d'une manière insignifiante sur le taux réglementaire autorisé de traceur en vue de celle-ci.

1.3.4. Techniques d'analyse et de contrôle par chromatographie gazeuse

Les analyses par chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides inférieurs, C6, C7, C8 peuvent être effectuées aussi bien sur colonne polaire que sur colonne apolaire.

Nous avons procédé aux essais suivant les deux techniques.

a) Chromatographie gazeuse sur colonne apolaire (Fig. 1)

Appareil: Aerograph modèle 1520

Colonne: Acier inox; longueur 2m; diam: 3 mm

Phase stationnaire: 4% SE 52 (phényl silicone)

Support: Aeropak 100 - 120 mesh

Gaz porteur: Azote: débit: 35 ml/min

Détecteur: Ionisation de flamme (F.I.D.)

Injection: 0,1 à 0,2 microlitre

Températures: Injecteur 300°C

Colonne: program. de 120 à 145°C par 6°C/min et ensuite
chauffage rapide jusqu'à 275°C

Détecteur: 300°C

Electromètre: 10 x 8

Enregistreur: Sargent; sens. 1mv

Dans ces conditions, l'acide butyrique (C4) est élué après environ 55 secondes, l'acide caproïque (C6) après 1' 20", l'acide énanthique (C7) après 1' 55", l'acide caprylique (C8) après 2' 35", l'acide caprique (C10) après 3' 30". On élue ensuite les acides gras supérieurs par chauffage rapide de la colonne jusqu'à 275°C. Il faut ensuite laisser refroidir la colonne jusqu'aux environs de 120°C.

Avec le modèle d'appareil dont nous disposons, il nous a été possible de faire une injection, c'est-à-dire de réaliser une analyse, toutes les 16 minutes, et on pourrait réaliser sans grande difficulté un gain de une ou deux minutes en commençant la programmation à température plus élevée.

b) Chromatographie gazeuse sur colonne polaire (Fig. 2)

Appareil: Aerograph modèle 1520

Colonne: Acier inox; longueur 2 m; diam 3 mm

Phase stationnaire: 15% D.E.G.S. (diéthylène glycol succinate)

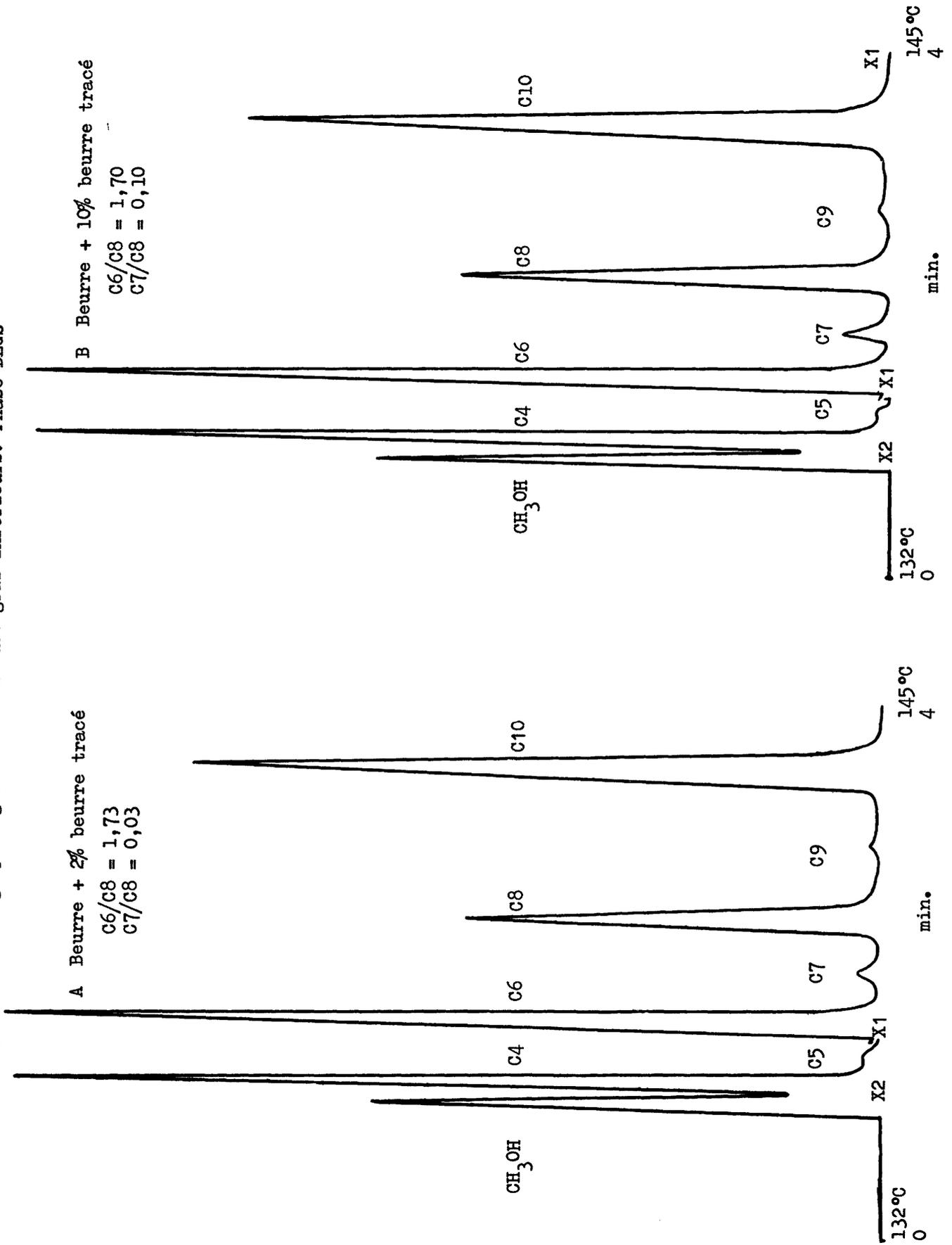
Support: chromosorb W. 60 - 80 mesh

Gaz porteur: Azote: débit 20 ml/min

Détecteur: Ionisation de flamme (F.I.D.)

Injection: 0,2 microlitre

Fig. 2: Chromatographie gazeuse des acides gras inférieurs: Phase DECS



Températures: Injecteur: 300°C

Colonne: program. de 132 à 160°C par 6°C/min et ensuite
chauffage rapide jusqu'à 215°C

Détecteur: 300°C

Electromètre: 10 x 8

Enregistreur: Sargent: sens.lmv

Dans ces conditions, l'acide butyrique (C4) est élué après environ 1' 10", l'acide caproïque (C6) après 1' 40", l'acide énanthique (C7) après 2', l'acide caprylique (C8) après 2' 20", l'acide pélargonique (C9) après 3', l'acide caprique après 3' 30".

La colonne est ensuite chauffée rapidement jusqu'à 215°C pour éluer les acides gras supérieurs. Après un temps suffisant, on la laisse refroidir en vue de l'analyse suivante.

Il nous était possible avec notre appareillage, d'effectuer une analyse toutes les 18 minutes, mais on pouvait encore gagner au moins deux minutes en débutant la programmation à une température de l'ordre de 150 à 160°C. Cependant, plus on augmente la température initiale, plus les difficultés techniques apparaissent lors de l'estimation des taux des acides inférieurs.

c) Avantages et inconvénients des deux techniques de chromatographie

Les utilisations respectives d'une colonne apolaire ou d'une colonne polaire pour la recherche des traceurs présentent des avantages et des inconvénients.

1. L'utilisation des colonnes apolaires

Ces colonnes présentent, si on les choisit bien (exemple: silicone), l'avantage de résister très bien aux hautes températures et aux programmations de température. Elles sont utilisables pendant de longues périodes et par conséquent, sont d'un prix de revient économique. Elles seront légèrement plus "rapides" que les colonnes polaires, toutes autres conditions étant égales.

La séparation des acides saturés inférieurs est largement suffisante en vue de leur détermination. Elles sont donc à préconiser plutôt que les colonnes polaires, si on recherche uniquement une addition de traceur sous forme de C7, dans le beurre. Cependant, si on entend en même temps disposer d'une analyse complète des acides gras principaux, les séparations deviennent insuffisantes et il est souhaitable d'utiliser des colonnes polaires.

2. L'utilisation de colonnes polaires

Ce sont les colonnes habituellement utilisées pour le dosage dans les corps gras des acides sous forme de leurs esters méthyliques.

Ces colonnes ont une température limite d'utilisation moins élevée que les colonnes précédentes, résistent beaucoup moins bien aux programmations de température et se dégradent relativement rapidement.

Cependant, la séparation des acides inférieurs saturés est toujours beaucoup plus aisée que celle des acides supérieurs insaturés et saturés. Si on veut mettre en évidence une addition de triglycérides de l'acide énanthique dans le beurre, on peut certainement utiliser une colonne polaire usagée, qui ne donnerait plus satisfaction pour une analyse globale de tous les acides gras.

Or de telles colonnes sont habituellement disponibles dans tous les laboratoires pratiquant des analyses d'acides gras par chromatographie gazeuse. A ce point de vue, l'emploi d'une colonne polaire peut être aussi économique.

Si on désire, non seulement mettre en évidence la présence d'une addition de traceur, mais aussi disposer d'une analyse plus complète des acides gras, il faut bien entendu utiliser une bonne colonne polaire.

D'autre part encore, les colonnes polaires séparent mieux les traces des acides impairs inférieurs et donnent lieu à une reproductibilité supérieure à celle donnée par les colonnes de silicone qui demandent une certaine saturation en acides gras et où on risque plus facilement des phénomènes de désorption.

L'emploi d'une colonne polaire ou d'une colonne apolaire ressortira donc au jugement de l'utilisateur qui en décidera suivant le but poursuivi (mise en évidence du traceur ou analyse plus complète) et en considérant le matériel disponible.

Celui-ci fixera également au mieux de ses intérêts, selon le même but poursuivi, les modalités analytiques concernant la technique de chromatographie gazeuse elle-même (colonnes, phases, températures, débits gazeux, détecteur etc...).

1.3.5. Contrôle de la présence du traceur dans la matière grasse butyrique

Ce contrôle, effectué par chromatographie gazeuse des esters méthyliques suivant une des techniques décrites dans le chapitre précédent reposera sur les données suivantes:

- a) Pour les beurres tracés par 1,2% de triglycérides de l'acide énanthique (C7)
on a, dans tous les cas, $0,6 C8 < C7 < 1,6 C8$, avec en moyenne $C7 = C8$ et $C7 < 0,7 C6$.

Sur les chromatogrammes réalisés suivant les techniques précédentes, la hauteur du pic de l'acide C7 sera pratiquement toujours intermédiaire entre les hauteurs des pics des acides C6 et C8.

- b) Pour la mise en évidence de beurres tracés par 1,2% de triglycérides dans un beurre normal, on aura toujours, si cette présence atteint seulement 1 à 2% de beurre tracé, $C7 > C9$, tandis que dans un beurre normal, C7 est toujours inférieur à C9.

Les chromatogrammes des figures 1 et 2 donnent une image peut être plus explicite de la composition des acides gras inférieurs de beurres purs, de beurres tracés et de leurs mélanges respectifs. Ils illustrent d'une manière éloquent, les possibilités analytiques permises par l'utilisation de 1,2% de triglycérides de synthèse de l'acide énanthique en tant que méthode de dénaturation de la matière grasse butyrique.

Il s'agit probablement du meilleur traceur étudié jusqu'à présent.

En effet, il est aisément mis en évidence dans le beurre avec une très grande sensibilité. Inclus dans un triglycéride, il ne peut pas être économiquement éliminé de la matière grasse butyrique.

Sa grande solubilité, même à froid, dans les graisses lui assure une meilleure dispersion au sein de celles-ci que la plupart des traceurs utilisés jusqu'à présent et notamment que les stérols. L'homogénéisation de la graisse marquée est réalisée très facilement.

Les prix de revient de la dénaturation et les techniques de contrôle seront économiques.

Il offre la même sensibilité à la détection que le bêta sitostérol, et cela par des techniques plus rapides, moins onéreuses et donc plus économiques.

D'autre part, il n'offre pas comme les stérols, l'inconvénient d'être présent en quantité supérieure à des traces dans les corps gras alimentaires.

Sa mise en évidence sera certainement plus sensible encore que celle de l'acide érucique de l'huile de colza et surtout elle sera plus aisée, plus rapide et moins coûteuse. D'autre part, il n'y aura jamais à craindre une influence quelconque du régime alimentaire sur la teneur en acide énanthique du beurre, comme c'est le cas pour l'acide érucique (1).

1.4. Considérations économiques

Si on fixe la dose de traceur à 1,2% de la matière totale, 12 kg de triglycérides en C7 seront nécessaires pour marquer une tonne de beurre. Le coût moyen du traceur par tonne de graisse butyrique se monterait sensiblement à 20 U.C. suivant les propositions reçues, mais ce prix est susceptible de décroître avec l'intensité de l'utilisation du traceur et le développement de la concurrence commerciale pour la fabrication.

Cependant, pour obtenir le prix de revient du marquage, il faut soustraire du prix du traceur, le prix de 12 kg de graisse butyrique; si celui-ci est la moitié de celui du traceur, le prix de revient du "marquage" sera de l'ordre de 10 U.C./tonne; il sera comparable au prix de revient du "marquage" par 100 gr de sésamol par tonne de graisse (règlement CEE n° 1390/69 du 18/7/69).

Si le prix de la graisse butyrique est plus élevé que cette valeur, le prix du "marquage" diminue; s'il est plus bas, il augmente en conséquence.

De toute manière, puisque le "marquage" par 12 kg de triglycérides de l'acide énanthique rend praticable et à un prix compétitif, l'utilisation de certains débouchés pour les excédents de beurre, en permettant un contrôle aisé du destin de la graisse "marquée", l'opération paraît assurément rentable.

1.5. Conclusions

Les triglycérides de l'acide énanthique (C7 ou n heptanoïque) constituent au point de vue sensibilité, efficacité et économie un excellent traceur possible pour la matière grasse butyrique.

Les acides impairs, suivant les spécialistes de la nutrition, sont parfaitement métabolisés au sein des organismes animaux et, à dose minime, comme ce serait le cas pour les beurres "marqués", ils ne sauraient en aucun cas avoir un effet toxique quelconque.

Leur emploi en tant que traceur pour la dénaturation des beurres peut donc être préconisé sans crainte.

Les triglycérides de l'acide énanthique étant les seuls que nous avons pu étudier actuellement et que nous savons pouvoir être rapidement commercialisables à un prix économiquement acceptable, nous estimons que les propositions suivantes sont de nature à favoriser un "marquage" efficace des excédents de beurre:

a) L'emploi comme traceur d'une dose de 1,2% de triglycérides de synthèse à plus de 95% d'acide heptanoïque.

b) Le contrôle du "marquage" par chromatographie gazeuse selon le critère suivant:

Beurre tracé: $0,6 C8 < C7 < 1,6 C8$

c) Le contrôle de la pureté des beurres par chromatographie gazeuse selon les critères suivants:

Beurre normal: $C7 < C9$

Beurre additionné par 2% ou plus

de 2% de beurre tracé: $C7 > C9$

N.B. Pour des considérations économiques, si le prix du "marquage" s'avérait encore trop élevé (prix très bas de la graisse butyrique à dénaturer), le taux de traceur fixé à 1,2%, pourrait être éventuellement réduit à 1%, soit 10 kg de triglycérides de l'acide heptanoïque par tonne de graisse butyrique.

Dans ce cas, le contrôle du "marquage" (1-5 b) se ferait selon le critère:

Beurre tracé: $0,5 C8 < C7 < 1,5 C8$

Quant aux critères permettant le contrôle de la pureté des beurres (1 - 5 - C), ils pourraient être gardés sans modification.

Pour des raisons analytiques, il n'est pas indiqué de descendre en-dessous de 1%, car dans ce cas, le critère $C7 > C9$ permettant le dépistage des beurres additionnés de 2% de "butter oil" tracé devient techniquement très difficilement contrôlable, et pour des doses de 0,7 à 0,8% de traceurs, il pourrait ne plus être vérifié.

2-2-II. Bibliographie

1. Commission des Communautés Européennes; Informations internes sur l'Agriculture 74 - Mai 1971
2. James A.T. and Martin A.J.P.; Biochem. J., 63: 144 - 1956
3. Jensen R.G., Quinn J.G., Carpenter D.L. and Sampugna J.; J. Dairy Sci. 50 - 119 - 1967
4. Hawke J.C.; J Dairy research 24: 336 - 1957
5. Kawashiro I., Tanabi H. and Iskii A.; Chem. Abstr. 55: 26291 - 1961
6. Hansen R.P., Shorland F.B. and Cooke J.N.; J. Dairy research 26: 190 - 1959
7. Herb S.F. and Madidman P.L. and Riemenschneider R.W.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 39: 142 - 1962
8. Iverson J.L., Eisner J. and Firestone D.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 42: 1063 - 1965
9. Lang K.; Biochemie der Ernährung, 561, Steinkopff Verlag - Berlin 1970
10. Markley F.K.; Fatty acids - Sec. Ed. Part III, 1515, Interscience Publishers - New-York 1964
11. Flavin M., Ortiz P.J., Ochoa S.; Nature, 4487, 823 - 1955
12. Erfle J.D. and al; J. Biol. Chem, 239, 6, 1920 - 1964
13. Lardy H.A. and Adler J.; J. Biol. Chem. 219, 943 - 1946
14. Friedberg F., Adler J. and Lardy H.; J. Biol. Chem. 219, 943 - 1946
15. Flavin M. and Ochoa S.; J. Biol. Chem - 220, 965 - 1957
16. Flavin M., Mendoza H.C. and Ochoa S.; J. Biol. Chem. 229, 981
17. Beck W., Flavin M. and Ochoa S.; J. Biol. Chem. 229, 997 - 1957
- 17 bis. Beck W. and Ochoa S.; J. Biol. Chem. 232, 931 - 1958
18. Tietz A. and Ochoa S. J. Biol. Chem. 234, 1394 - 1959
19. Kaziro Y., Ochoa S., Warner R. and Chen J.; J. Biol. Chem. 236, 1917 - 1961
20. Mazumber R., Sasakawa T. and Ochoa S.; J. Biol. Chem. 237, 3065 - 1962
21. Kaufmann H.P. und Mankef A.; Fette - Seifen - Anstrichmittel 7, 541 - 1966
22. Flanzky J. et col.; Journées de l'ITERG sur les corps gras animaux Paris 17 - 19 avril 1972 - Rev. Fse Corps gras 19- 359- 1972
23. Gunstone F.D.; 59 London Chapman and Hall L.T.D. - 1958
24. Gruger E.H.; Marine Oils - 3 - 30 - M.E. Stansby, the Avi Publishing Co, Westport, Co. 1967
25. Gruger E.H., Nelson R.W. and Stansby M.E.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 41, 662 1964
26. Addison R.F. and Ackman R.G.; Lipids, 5, 554 - 1969.

III. LES GLYCERIDES PARTIELS ET LES MONOGLYCERIDES

1. Choix du traceur

Grâce à leur polarité moléculaire, les monoglycérides et les diglycérides peuvent être aisément séparés des triglycérides par des techniques de chromatographie. Il existe deux types de mono et de diglycérides suivant la position de l'acide ou des deux acides gras sur le radical du glycérol, les 1 et 2 monoglycérides et les 1 - 3 et 1 - 2 diglycérides.

Les diglycérides se rencontrent en quantité beaucoup plus importantes dans les matières grasses naturelles que les monoglycérides et les méthodes qui permettent de les estimer sont moins nombreuses et plus onéreuses que celles qui peuvent être appliquées pour les monoglycérides. On rencontre des 1 - 2 diglycérides à des taux supérieurs à 1% des glycérides de la graisse butyrique non lipolysée où ils constitueraient des produits intermédiaires de la synthèse des triglycérides.

Pour toutes ces raisons, les diglycérides ne présentent que peu d'intérêt comme traceurs possibles de la matière grasse du lait et nous nous limiterons à l'étude des monoglycérides commerciaux. Ceux-ci sont préparés industriellement pour servir principalement d'agents émulsifiants.

Les 1 monoglycérides sont beaucoup plus stables que les 2 monoglycérides qui ont tendance à se transformer jusqu'à un certain équilibre en 1 monoglycérides.

Ces derniers peuvent être dosés par oxydation périodique suivant une méthode normalisée. Pour obtenir les monoglycérides totaux selon cette méthode, il est nécessaire de procéder à l'isomérisation des 2 monoglycérides en 1 monoglycérides par l'acide perchlorique.

La chromatographie sur plaque ordinaire de gel de silice ou sur colonne d'acide silicique permet une séparation convenable des monoglycérides totaux des 1 - 2 et 1 - 3 diglycérides et des triglycérides.

En chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégné de 5% d'acide borique on peut séparer de manière satisfaisante les 1 et 2 monoglycérides (1).

Le lait frais contient naturellement une très faible proportion de monoglycérides, de l'ordre de 0,05% par rapport à la matière grasse et une quantité plus considérable de diglycérides, soit environ 1,26 à 1,59% (2). Cependant, dans la graisse de lait rance, le taux de monoglycérides peut dépasser 1% (3).

La teneur totale en monoglycérides du lait et de ses dérivés varie d'ailleurs selon les traitements industriels subis par la matière première. R.G. Jensen et col. (4) donnent une teneur de 0,077 mM/100 gr pour le lait frais, 0,145 pour le lait pasteurisé, 0,206 pour le lait homogénéisé, 0,119 pour la crème à 40%,

0,189 pour le beurre et 0,354 pour certains fromages.

Pour différents "Cheddars", De Man(5) a mis en évidence des taux de 0,8 à 3,2% de monoglycérides et de 5,6 à 15,6% de diglycérides.

Le beurre frais contiendrait donc naturellement environ 0,05% de monoglycérides. Cependant, des teneurs cinq ou six fois plus élevées ne sont pas à exclure pour des beurres rances.

La présence de monoglycérides en quantités supérieures à 0,05% de la matière grasse, dans le lait et dans les beurres, est à mettre en corrélation avec le degré de lipolyse, et on peut admettre que dans un beurre de qualité commerciale, les monoglycérides totaux n'excèdent pas 0,1%.

Cependant, les échantillons reçus dans un laboratoire de contrôle présentent le plus souvent un début d'altération, voire une altération poussée et, dans ce cas, la teneur en monoglycérides peut être multipliée au moins par un coefficient de 3 ou 4.

La mise en évidence de monoglycérides dans le beurre a été utilisée en vue de la recherche de la présence dans le beurre de graisses de substitution obtenues par interestérisation (6). L'interestérisation conduit en effet toujours, à la formation de quantités variables de monoglycérides, suivant les conditions du procédé.

La présence de monoglycérides dans le beurre, en quantités variables suivant le degré de lipolyse auquel celui-ci a été soumis, conduira naturellement à des problèmes qu'on étudiera ci-dessous, mais il importe premièrement d'examiner si le "marquage" des beurres par des monoglycérides peut être accepté biologiquement et économiquement.

1.1. Le problème biologique

Les monoglycérides existent à l'état naturel dans des stades intermédiaires de l'existence des corps gras. On les rencontre notamment dans le tube digestif de l'homme où ils résultent de l'hydrolyse des triglycérides.

Ils s'intègrent donc sans danger dans le métabolisme des graisses.

Commercialement, les monoglycérides sont préparés par synthèse.

Deux procédés sont utilisés, l'estérisation directe avec le glycérol et l'interestérisation d'un triglycéride avec deux molécules de glycérol.

Pour des raisons économiques, c'est principalement la deuxième méthode qui est utilisée dans l'industrie; elle nécessite l'emploi d'un catalyseur, la réaction s'effectuant sous pression réduite et à une température de l'ordre de 200 à 250°C. Le catalyseur est souvent alcalin et doit être éliminé par lavage avec des solutions aqueuses de sel ou de sulfate de sodium ou par des traitements acides.

Les monoglycérides commerciaux contiennent environ 50 à 60% de monoglycérides,

40 à 45% de diglycérides et 5 à 10% de triglycérides.

Des monoglycérides dont la pureté atteint 90 à 97% peuvent être préparés à partir de ces monoglycérides industriels par distillation moléculaire.

En fait, ce ne sont pas les monoglycérides en tant que tels qui sont à craindre du point de vue biologique, mais les produits de dégradation et de polymérisation qui pourraient apparaître lors de la synthèse à température trop élevée et l'élimination non complète du catalyseur.

Pour produire un monoglycéride conforme aux exigences de l'hygiène, il faudrait opérer par estérification directe, en l'absence de tout catalyseur, à des températures inférieures à 250°C, dans un matériel adapté, en partant de glycérine "codex" et d'acides gras bidistillés et soumettre le produit terminé à une désodorisation poussée pour éliminer complètement les produits secondaires formés au cours de l'estérification (7).

Si on considère le problème législatif, il faut bien avouer qu'à ce sujet les législations européennes sont fort discordantes et toujours très prudentes.

Aux Pays-Bas, les mono et diglycérides inoffensifs non polymérisés sont autorisés dans les graisses de consommation sans indication de dosage.

En Belgique on admet leur présence à une dose maximum de 1% dans les produits de la pâtisserie, de la confiserie et dans les margarines.

En Italie, on autorise jusqu'à 3% de monoglycérides et diglycérides dans les graisses pour pâtisserie, mais 0,4% dans les margarines.

En France, on autorise l'incorporation de 2% de mono-diglycérides dans les corps gras alimentaires, mais on spécifie en outre que ceux-ci ne peuvent contenir que les acides stéarique, palmitique, oléique et linoléique.

Même dans les crèmes glacées, les diverses législations admettent la présence de quantités réduites de monoglycérides.

On constate généralement que la méfiance dont font preuve les législations à l'égard de l'utilisation de monoglycérides concerne surtout les matières premières mises en oeuvre, le matériel et les techniques d'estérification.

Quant aux produits laitiers, auxquels on veut garder un caractère particulier de pureté, il est psychologiquement difficile de l'additionner d'un élément étranger, mais il faut noter à ce sujet qu'on peut aussi bien fabriquer des monoglycérides à partir du beurre qu'à partir d'un autre corps gras.

Pratiquement, l'incorporation de quantités de l'ordre de 2% de monoglycérides au "butter oil" ne devrait pas soulever de problèmes d'ordre biologique puisque de telles doses sont autorisées dans les corps gras alimentaires pour plusieurs pays de la CEE.

Il faut espérer une uniformisation des législations européennes à ce sujet.

1.2. Le problème économique

Les prix commerciaux des monoglycérides industriels varient suivant leur nature, la concentration en monoglycérides et la pureté résultant du procédé de fabrication industrielle.

On peut escompter un prix moyen de l'ordre de 0,75 U.C. par kg pour les monoglycérides à 60% et de 1 U.C. par kg pour les monoglycérides à 90%.

Il est évident que dans ces conditions, le monoglycéride étant destiné à être utilisé comme traceur et non comme émulsifiant, on a tout intérêt à se servir du produit le plus concentré.

Un prix de 1 ou 1,1 U.C. par kg est parfaitement acceptable sur le plan économique pour la dénaturation du butter oil.

1.3. Le problème analytique

La détermination analytique du taux de monoglycérides dans la graisse de beurre n'est pas une opération facile. Les monoglycérides peuvent être séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice et dosage gravimétrique à partir de 2 gr de graisse ou directement par oxydation périodique (1 monoglycérides) si leur teneur est relativement importante. Cependant, dans le cas de la graisse de beurre, il faut au préalable procéder à un enrichissement de la fraction à analyser. Cet enrichissement a été pratiqué selon la technique décrite par Naudet (8). L'oxydation périodique a été effectuée suivant la méthode officielle de l'AOC (10). Les essais doivent être effectués en triple et la quantité de monoglycérides soumis à l'analyse doit être au moins de 4 mgr (10 gr de butter oil).

En chromatographie sur couche mince de silice, la limite de sensibilité obtenue pour la mise en évidence de monoglycérides dans une graisse est d'environ 0,05% et correspond sensiblement à la teneur normale d'un beurre relativement frais. Cependant un dosage par photodensitométrie est impossible à cette teneur.

Les monoglycérides du lait et du beurre ont encore été déterminés par diverses autres techniques plus élaborées, basées en général sur l'oxydation périodique avant et après isomérisation (9) et des mesures colorimétriques par réaction avec l'acide chromotrope (13). De manière générale, ces méthodes sont trop onéreuses pour être appliquées couramment dans un laboratoire de contrôle.

Cependant, la chromatographie gazeuse des dérivés triméthylsilylés pourrait être retenue en vue de l'analyse des monoglycérides commerciaux (14).

Il apparaît comme évident que le dosage précis des monoglycérides n'est pas une méthode à préconiser pour le contrôle de la pureté des beurres. Seul un test rapide pourrait être réalisé. La chromatographie sur couche mince de silice de la graisse non altérée suivie d'une révélation par carbonisation, par un indicateur fluorescent telle la 2-7 dichlorofluorescéine ou par l'acide phospho-

molybdique en solution dans l'éthanol est la méthode la plus indiquée pour réaliser ce test.

D'autre part, si le "butter oil" frais ne paraît pas contenir plus de 0,1% de monoglycérides, il n'en est pas de même du "butter oil" âgé, ayant subi un début de rancissement, où le taux de monoglycérides observé atteint 0,3% et peut être davantage, de sorte qu'un échantillon de graisse altérée où on révèle la présence de 0,3% de monoglycérides peut être fortement suspecté d'une addition de ce produit sous une forme ou une autre, mais il n'y a aucune preuve formelle, à moins qu'on ne connaisse l'origine de l'échantillon.

D'autre part, le lavage de la matière grasse a toujours tendance à réduire le taux de monoglycérides.

Pour la graisse de fromage, la proportion de monoglycérides est de loin supérieure à celle existant dans le beurre et atteint en moyenne 1 à 3% pour le Cheddar (5). Il est évident que les monoglycérides ne peuvent constituer un traceur pour la graisse butyrique des fromages.

Pour le cas des beurres et des "butter oil", on peut admettre un taux maximal de 0,2% pour des graisses fraîches et 0,3 à 0,4% pour des graisses rances. Si on introduit artificiellement 2% de monoglycérides purs dans un "butter oil", on pourra donc rechercher la présence éventuelle de 10 à 20% de ce "butter oil" tracé dans une graisse butyrique normale.

2. Choix du taux de traceur

Pour des motifs pratiques, étant donné que la présence de monoglycérides exerce une influence sur les propriétés physiques du beurre, et pour des raisons législatives, parce que l'addition de monoglycérides aux matières grasses est souvent limitée par les législations à 2%, la teneur en monoglycérides qu'on pourrait ajouter au "butter oil" peut difficilement dépasser 2%.

Dans ce cas, une teneur aussi élevée peut être facilement mise en évidence par chromatographie sur couche mince et être tenue pour tout à fait anormale pour un "butter oil" ordinaire.

Une telle teneur diluée 10 fois (10% de beurre tracé dans un beurre normal) sera encore anormale pour un beurre de consommation, mais l'interprétation du test ne sera plus possible dans le cas de beurres âgés et rances.

Différents types de monoglycérides peuvent être obtenus. Il importe de disposer des produits les plus purs possibles (pureté de 90% ou supérieure à 90%), exempts de catalyseurs.

Les monoglycérides d'acides insaturés peuvent être mis en évidence sur plaque de gel de silice avec une plus haute sensibilité et par des révélateurs plus maniables que les monoglycérides d'acides saturés.

Pour ces derniers, on utilisera la 2 - 7 dichlorofluorescéine, peu sensible ou la carbonisation, méthode encombrante et difficilement reproductible, en contrôle courant, tandis que pour les monoglycérides d'acides insaturés, on pourra effectuer la révélation par une solution éthanolique à 20% d'acide phosphomolybdique; cependant, les monoglycérides d'acides insaturés sont souvent beaucoup moins purs que les monoglycérides saturés.

3. Contrôle du monoglycéride

Ce contrôle est effectué le plus simplement par oxydation périodique suivant une méthode normalisée (ex: AOCS Cd 11-517 - 1960)(9) (10) ou par chromatographie sur colonne de silice et gravimétrie (11) (12).

Comme il y a toujours un peu de 2 monoglycérides parmi les 1 monoglycérides, la deuxième méthode donne des résultats plus précis et systématiquement légèrement plus élevés (5 à 10%).

Il est souhaitable que le monoglycéride préconisé comme traceur contienne au moins 90% de monoglycérides totaux (dosage gravimétrique) ou 85% de monoglycérides (dosage par oxydation périodique).

L'origine du monoglycéride doit également pouvoir être contrôlée. La composition des acides gras sera déterminée par chromatographie gazeuse (fig. 1 et 2).

Il est souhaitable, pour l'alimentation humaine, d'utiliser des monoglycérides obtenus par estérification directe du glycérol par un acide gras distillé; on a intérêt à utiliser un monopalmitate ou un monoléate purifié contenant au minimum 90% d'acide palmitique ou 90% d'acide oléique.

Généralement les monoglycérides commerciaux sont cependant fabriqués à partir de graisses animales hydrogénées ou de graisses végétales et nous n'avons pas pu obtenir des monooléates contenant au-delà de 80% d'acide oléique.

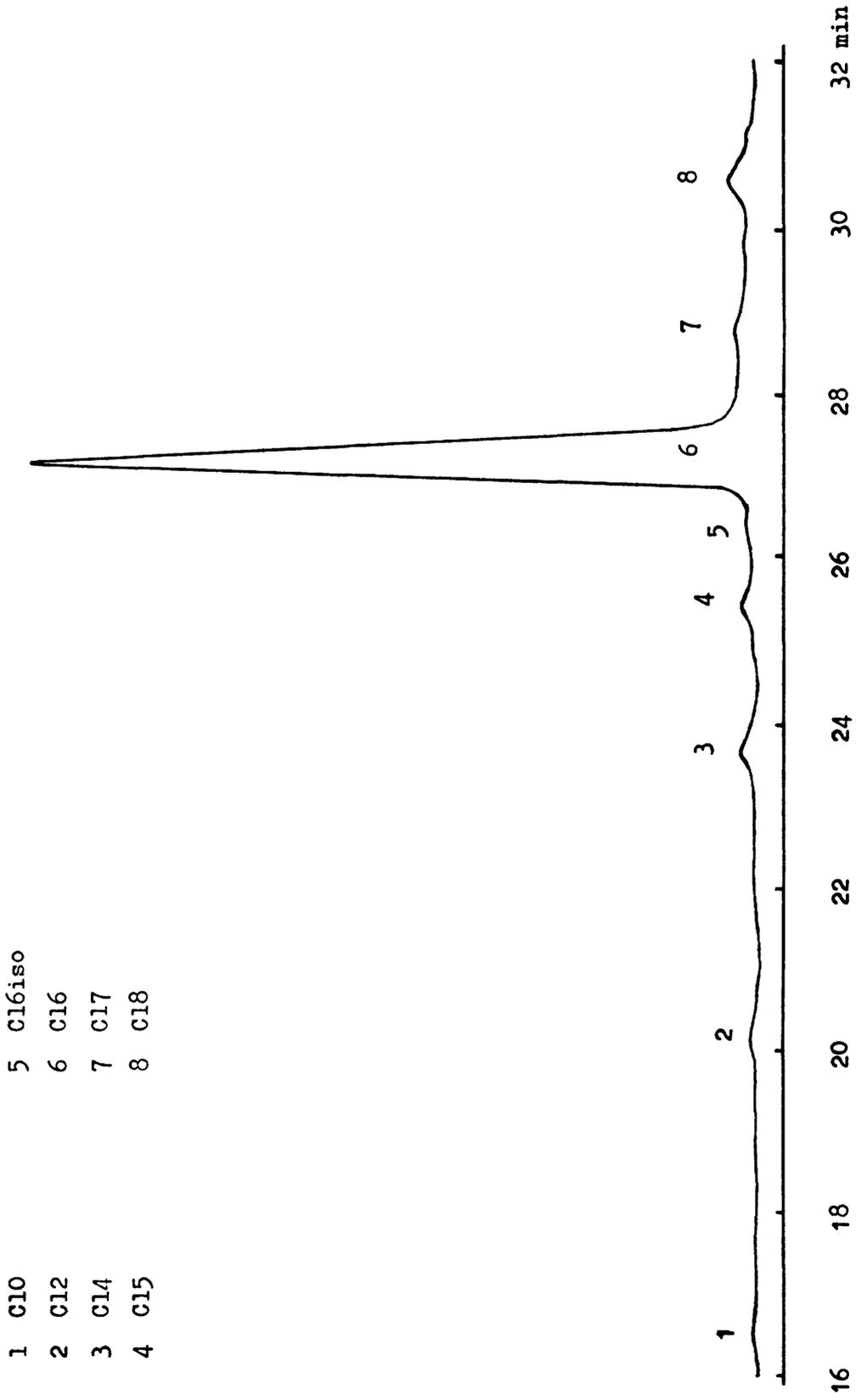
Etant fluide à température ordinaire, la monooléine se prête bien mieux à l'homogénéisation dans le "butter oil" que la monopalmitine, le point de fusion de cette dernière étant de l'ordre de 72°C.

4. Contrôle du "marquage"

L'addition de 2% de monoglycérides de pureté égale à 90% à un "butter oil" correspond à la présence dans la graisse tracée de 1,8% de monoglycérides totaux réels. Ceci peut être vérifié par la méthode de l'oxydation périodique ou plus simplement par chromatographie sur couche mince après révélation par carbonisation par une solution concentrée d' H_2SO_4 saturée par le bichromate et photodensitométrie.

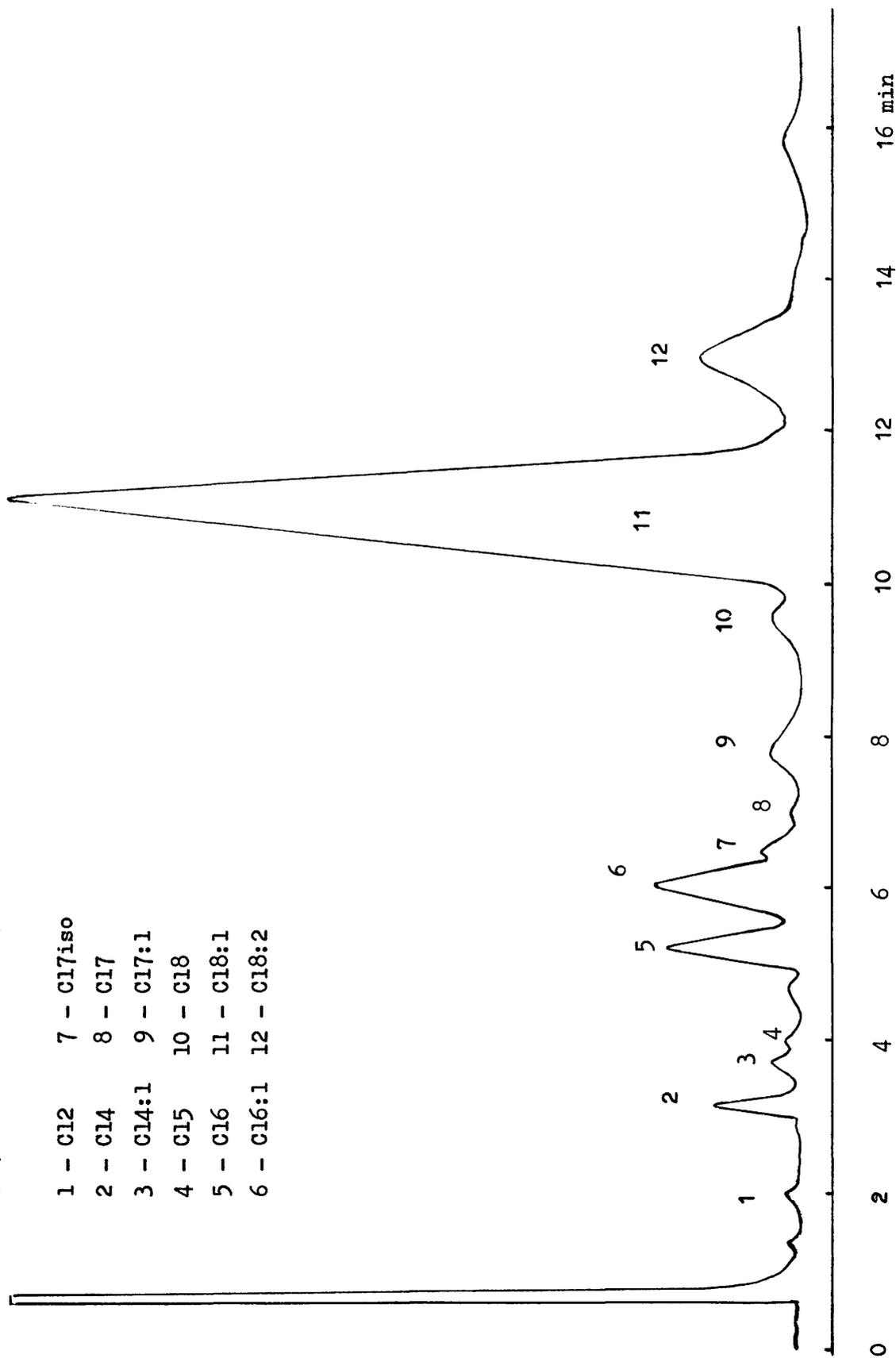
Cependant ces méthodes sont longues, demandent un matériel spécialisé, sans

Fig. 1 Chromatographie gazeuse des acides gras d'un monopalmitate d'estérification directe - Esters méthyliques
(91% monoglyc., 9% ac. palmitique)



Colonne: 2 m x 3 mm; acier inox, 18% DEGS sur chrom. W 60-80 - T° 50 à 200°C. - 25 ml N2/min - F.I.D.

Fig. 2 Chromatographie gazeuse des acides gras d'un monooléate d'interestérification - Esters méthyliques
(60% de monoglyc., 76% ac. oléique)

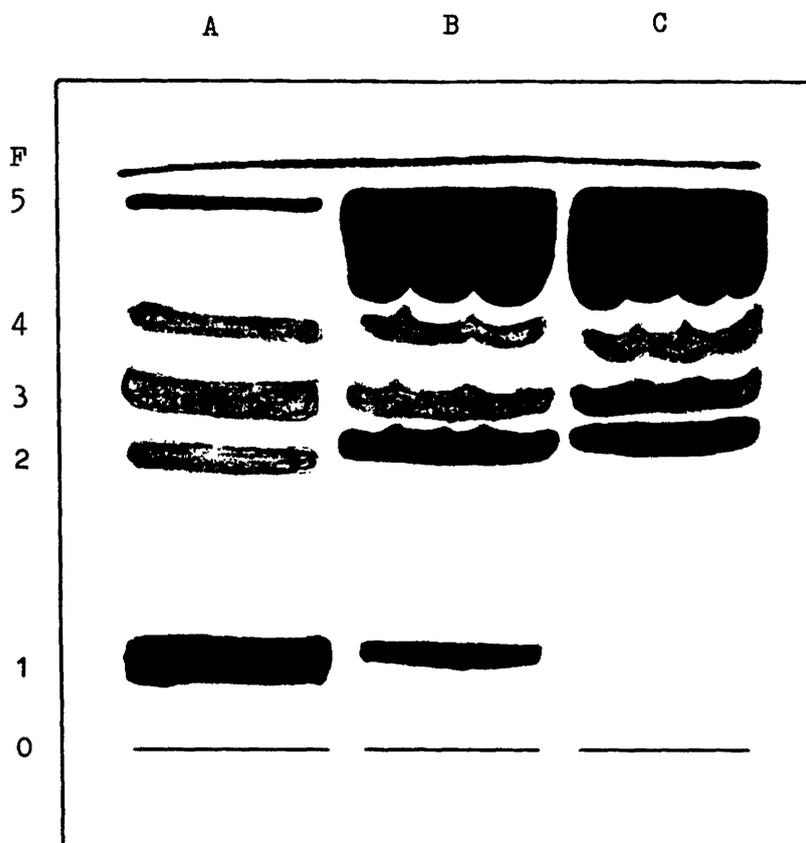


Colonne: 2 m x 3 mm; acier inox; 18% DEGS sur chrom. W 60 - 80; T° 185°C; 125 ml N₂/min.; F.I.D.

Fig. 3 C.c.m. de gel de silice des monoglycérides et des beurres

Ether de pétrole 60 - 80 - Diéthyl éther H. Ac. (50 - 50 - 1,5)

Révélateur: 20% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol



A Monooléate (60%) (1 mgr)
B Beurre + 2% monooléate (5 mgr)
C Beurre normal (5 mgr)

0 Origine
1 Monoglycérides
2 1 - 2 diglycérides et stérols
3 1 - 3 diglycérides
4 Acides gras
5 Triglycérides
F Front - Esters de stérols - Hydrocarbures

garantir une grande précision.

Un test plus simple sera réalisé par comparaison avec un témoin. On disposera d'un échantillon de graisse de beurre gardée au frais auquel on aura ajouté le taux préconisé de monoglycérides. On effectuera une chromatographie sur la même plaque de l'échantillon témoin et des échantillons à tester. Après révélation, on comparera à défaut de photodensitomètre l'intensité de coloration des divers spots de monoglycérides.

Comme réactif de vaporisation, si le monoglycéride est un monooléate, on a intérêt à utiliser une solution à 20% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol, ce réactif offrant une meilleure sensibilité pour l'oeil que la 2 - 7 dichlorofluorescéine et étant plus maniable que les solutions d'acide sulfurique (fig. 3).

5. Mise en évidence des monoglycérides dans les beurres

Chromatographie sur couche mince de gel de silice des glycérides (fig. 3)

De nombreux systèmes de solvants séparent bien les divers types de glycérides d'une matière grasse. Parmi les plus maniables, on trouve les mélanges d'éther de pétrole et d'éther diéthylique.

Les mélanges d'éther de pétrole (60 - 80), d'éther diéthylique et d'acide acétique (50 - 50 - 1,5) sont capables de faire migrer les monoglycérides à une distance suffisante de la ligne de base pour qu'il n'y ait pas de contamination par des lipides plus polaires tels les phospholipides.

La quantité déposée est fonction de la sensibilité que permettra le révélateur.

Par carbonisation à l'acide sulfurique ou par vaporisation par des solutions à 20% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol, on peut à la limite mettre en évidence en pratique des spots contenant 0,05% de monoglycérides.

Les beurres normaux non altérés contenant pratiquement toujours moins de 0,2% de monoglycérides, ceux-ci ne sont pas révélés à partir de quantités déposées en spots de l'ordre de 5 mgr. de glycérides totaux.

On préparera des solutions à 10% de graisse de beurre à examiner dans l'éther de pétrole, et on prélèvera à l'aide d'une micropipette 0,05 ml de chaque solution à examiner que l'on déposera sur la plaque de gel de silice à développer.

Les spots étant déposés à des intervalles de 2 cm, on peut réaliser huit tests par plaque plus un témoin. Les plaques sont soumises à un développement ascendant sur 15 cm avec le solvant éther de pétrole - éther diéthylique - Acide acétique (50 - 50 - 1,5).

Les plaques sont séchées à l'air libre pendant 20 minutes, puis vaporisées

à l'aide d'une solution à 20% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol et séchées 20 minutes à l'étuve à 105°C si le monoglycéride susceptible d'être ajouté est du type monooléate.

Si le monoglycéride ajouté contient essentiellement des acides saturés il faut procéder par carbonisation à l'acide sulfurique ou vaporiser par une solution à 0,2% de 2 - 7 dichlorofluorescéine dans l'alcool, cette dernière méthode étant un peu moins sensible que les précédentes.

Les monoglycérides présentent normalement un Rf d'environ 0,15, les 1 - 2 diglycérides et les stérols, un Rf de 0,55 et les triglycérides forment une bande plus ou moins continue presque au front du solvant.

Dans de telles conditions, si les beurres examinés sont frais ou peu altérés, c'est à dire toujours propres à la consommation, les monoglycérides ne seront pas mis en évidence et on ne verra aucun spot à l'endroit de leur migration effective. On opérera avec un ou deux témoins constitués par un beurre frais additionné de 0,2 ou 0,3% de monoglycérides.

Les échantillons seront fondus à une température n'excédant pas 50°C.

Le test permettra donc de déceler facilement 10% d'un beurre additionné de 2% de monoglycérides, dans un beurre normal.

Il est réalisable grâce à une méthode très simple, rapide et économique, puisque par plaque de gel de silice du commerce (+ 0,6 U.C.) on dépose 9 spots (8 tests et un témoin).

L'interprétation des résultats ^{obtenus} par cette méthode doit cependant être limitée aux cas des beurres frais ou peu altérés (propres à la consommation). Elle ne peut être conçue de la même manière et est donc difficilement applicable en ce qui concerne l'analyse de la phase grasse des fromages et aussi, fait qui arrive fort souvent dans la pratique du contrôle laitier, lorsque les échantillons ont subi une altération poussée.

Notons également que la plupart des législations autorisent l'adjonction de monoglycérides (0,5% en moyenne) comme émulsificateurs dans les crèmes glacées et les glaces de consommation.

Il est donc exclu que ceux-ci puissent servir de traceurs dans de tels produits.

6. Variations de la composition glycéridique des beurres sous l'influence de divers facteurs

La teneur en monoglycérides de la phase grasse des produits laitiers dépend en premier lieu de la lipolyse, donc de l'acidité. Cependant, on n'observe pas toujours une corrélation étroite entre l'acidité, la rancidité et le taux de monoglycérides de la graisse de lait.

Le chauffage de la matière grasse du beurre à 40 - 50°C favorise l'hydrolyse de la matière grasse et l'apparition de monoglycérides.

Des beurres ne contenant que des traces de monoglycérides (0,1%) ont vu leur taux augmenter jusqu'à 0,2% après 8 fusions successives à environ 45°C pendant une demi-heure, puis réfrigération à 4°C jusqu'au lendemain. Le chauffage prolongé de la graisse au delà de 70°C produit un réarrangement partiel des glycérides que nous avons mis facilement en évidence grâce à l'utilisation de monoricinoléate.

Les lavages répétés des beurres rances contenant un taux de monoglycérides supérieur à 0,2% peut faire baisser ce taux en dessous de cette valeur bien que les monoglycérides ne soient pas solubles dans l'eau.

7. Elimination des monoglycérides des matières grasses

Les monoglycérides, étant solubles dans la matière grasse, sont très difficilement extractibles par des solvants courants; cependant leur molécule présentant une partie polaire, des lavages à l'eau successifs en réduisent sensiblement le taux, tout en entraînant cependant des pertes en triglycérides. Un tel processus d'élimination des monoglycérides serait certainement très partiel et il ne pourrait sans doute constituer un moyen économique de réduire le taux de traceur.

D'autre part, les méthodes de désodorisation à la vapeur, sous vide poussé, sont susceptibles d'enlever une grande partie des monoglycérides en même temps que les acides gras. En outre, l'agitation mécanique entretenue à haute température provoque un réarrangement de la structure glycéridique, de telle sorte que la quantité de monoglycérides totaux peut être facilement réduite à des chiffres moins suspects.

8. Conclusions

Si l'adjonction de 2% de monoglycérides dans une graisse de beurre est de nature à rendre possible le contrôle rapide des beurres marqués par un test simple, le contrôle des fraudes sera plus malaisé et devra se limiter à la mise en évidence de 10% de beurre "marqué" dans un beurre normal.

La graisse de fromage, les crèmes glacées, les graisses très altérées seront exclues du contrôle pour les motifs cités ci-dessus.

Les graisses désodorisées à la vapeur et sous vide sont susceptibles d'avoir perdu une quantité importante de leurs monoglycérides, soit par élimination directe, soit par un réarrangement glycéridique.

En conclusion, l'adjonction de monoglycérides à la graisse de beurre aux fins de servir d'élément traceur unique n'est pas recommandable. Ceux-ci pourraient par contre être utilisés comme traceurs d'appoint, rapidement mis en évidence.

Dans ce cas, la quantité additionnée souhaitable serait de l'ordre de 2%. Il serait judicieux de préférer les monoglycérides formés par estérification directe de glycerol à usage pharmaceutique et d'un acide gras distillé tel l'acide palmitique ou l'acide oléique, ce dernier étant plus facilement mis en évidence par des révélateurs sensibles en chromatographie sur couche mince.

Le contrôle des monoglycérides serait effectué par oxydation périodique ou par gravimétrie après séparation sur une colonne d'acide silicique (monoglycérides totaux) et par chromatographie gazeuse (composition des acides gras).

Le contrôle des beurres "marqués" et la recherche de quantités anormales de monoglycérides dans les beurres seraient effectués par chromatographie sur couche mince et révélation par un révélateur adéquat, par comparaison avec un ou deux témoins.

On peut considérer que pour un beurre frais ou peu altéré (consommable), le taux de monoglycérides est inférieur à 0,2% et même le plus généralement inférieur à 0,1%. Le beurre très altéré, le lait rance, le fromage peuvent contenir plus de 0,2% de monoglycérides parmi la matière grasse totale.

Le fait d'obtenir entre 0,1 et 0,2% de monoglycérides dans un beurre non rance constitue donc un indice de suspicion valable, mais la teneur en monoglycérides totaux d'un beurre consommable doit dépasser 0,2% pour pouvoir être considérée comme anormale.

La diminution relative du taux de monoglycérides des graisses, suite à des lavages répétés par l'eau, à la désodorisation à la vapeur sous vide et au réarrangement des glycérides sous l'influence des traitements thermiques énergiques, l'existence de lipolyse intense dans les beurres rances et les fromages, la présence autorisée de monoglycérides d'addition dans certains produits laitiers de même que la relative imprécision des tests de chromatographie sur couche mince restreignent considérablement l'efficacité de l'addition de monoglycérides en tant que traceurs des beurres.

N.B. Voir page 78.

9. Cas particulier

Les monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée

9.1. Composition et mise en évidence du produit commercial

Nous avons vu au chapitre 2.2.I B que l'huile de ricin hydrogénée pouvait constituer un traceur facilement mis en évidence dans les beurres, mais qu'elle pouvait être difficilement utilisée comme tel, étant donné son point de fusion (env. 87°C) trop élevé.

Les monoglycérides de ricin hydrogéné ont un point de fusion considérablement plus bas (ca 65°C) et peuvent être facilement dispersés dans la matière grasse.

Ce sont des produits fabriqués par interestérisation du ricin hydrogéné avec le glycérol, contenant environ 45% de monoglycérides, 45% de diglycérides et 10% de triglycérides. L'acide 12-hydroxystéarique constitue au moins 80% des acides gras totaux. Leur prix est de l'ordre de 0,8 U.C. par kg.

Les monoglycérides de l'acide 12-hydroxystéarique peuvent être facilement mis en évidence par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

Si on effectue le développement avec le même solvant que les monoglycérides des acides non hydroxylés, les monoglycérides de l'acide 12-hydroxystéarique migrent à peine de l'origine, les 1-2 diglycérides de l'acide 12-hydroxystéarique migrent un peu moins loin que les monoglycérides ordinaires et la trihydroxystéarine migre un peu moins loin que les stérols.

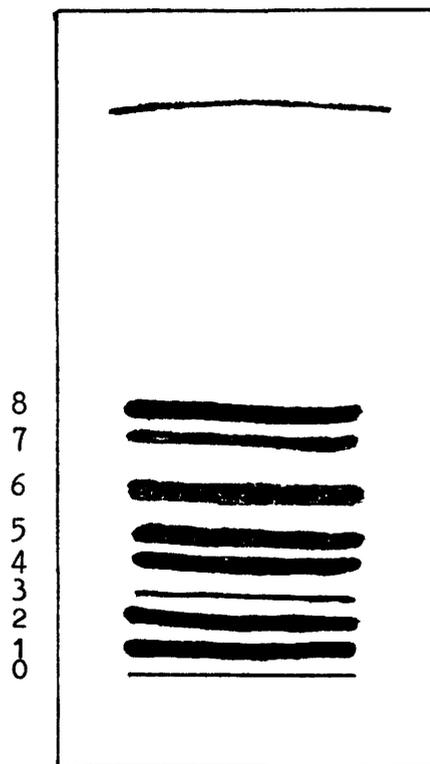
Les monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée contiennent naturellement aussi une proportion importante de diglycérides mixtes de deux acides gras, dont l'acide 12-hydroxystéarique et un acide non hydroxylé, et des traces de triglycérides d'acides gras ordinaires (Fig. 4).

9.2. Avantages et inconvénients des monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée

Par rapport aux monoglycérides ordinaires, les monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée sont plus solubles dans les solvants polaires et sont donc susceptibles de donner des pertes plus importantes par lavages systématiques à l'eau, quoique ce fait n'ait pas été vérifié.

Comme pour les monoglycérides ordinaires, les traitements thermiques intenses peuvent provoquer un réarrangement des glycérides; cependant ici, l'acide 12-hydroxystéarique demeurant présent dans la graisse, les di ou triglycérides contenant une molécule d'acide 12-hydroxystéarique sont

Fig. 4 C.c.m. de gel de silice des monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée
Ether de pétrole 60 - 80 - Diéthyl éther - HAC (50 - 50 - 1,5)
Révélateur: 20% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol



- 0 Origine
- 1 Monohydroxystéarine
- 2 1 - 2 Dihydroxystéarine
- 3 Monostéarine
- 4 1 - 3 Dihydroxystéarine
- 5 Diglycéride 1 - 2 mixte (1 OH)
- 6 Diglycéride 1 - 3 mixte (1 OH)
- 7 Trihydroxystéarine
- 8 Triglycéride mixte (2 OH) + stérols

séparables des autres types de glycérides sur plaque de gel de silice et le réarrangement des glycérides n'exclut pas qu'on puisse mettre en évidence la présence de cet acide hydroxylé.

De toute manière, les monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée ne présentent aucun avantage analytique en tant que traceur du beurre sur l'huile de ricin commerciale vierge et ils coûtent plus cher.

L'interstérification telle qu'elle est pratiquée, pourrait peut-être susciter des réserves de nature toxicologique et demander un contrôle difficile. En conséquence, nous pensons qu'il est préférable d'utiliser l'huile de ricin vierge telle quelle, comme traceur, plutôt qu'un de ses dérivés.

N.B. Analyse des dérivés triméthylsilylés des monoglycérides par chromatographie gazeuse.

Le contrôle des monoglycérides industriels (taux de monoglycérides) ainsi que le dosage et la mise en évidence de faibles quantités de monoglycérides dans les beurres tracés peuvent être réalisés fort simplement par chromatographie gazeuse des dérivés triméthylsilylés en utilisant un étalon interne. Bien que certains préconisent pour la séparation, des colonnes de verre (14), nous avons utilisé avec succès une colonne en acier inoxydable de 50 cm de longueur et de 3 mm de diamètre, analogue à celles utilisées pour la séparation des stérols (4% SE 52 sur Aeropak 30, 80-100 mesh). L'étalon était de l'acétate de cholestérol. On travaillait en programmation de température de 230 à 340°C par 7°C/min. Dans ces conditions, les dérivés silylés des monoglycérides en C18 étaient élués en moins de 6 minutes et les triglycérides en C57 en moins de 30 minutes.

Les coefficients d'étalonnage, par rapport à l'acétate de cholestérol, des dérivés des monoglycérides en C16 et en C18 étaient de 0,85.

Le contrôle des échantillons de beurre tracé serait facilité si on utilisait pour le "marquage" un monoglycéride purifié, préparé à l'aide de glycérol et d'un acide gras distillé, par exemple, du monopalmitate à 90% de monoglycérides et à plus de 90% d'acide palmitique.

2-2-III Bibliographie

1. Thomas A.E., Sharoun J.E. and Ralston H., J. Am. Oil Chemists' Soc. 42; 789 (1965)
2. Timmen H., Dimick P.S., Patton S., 18e Congr. lait. Sydney A - 2 - 2 (1970)
3. Jensen R.G., Morgan M.E., J. Dairy Sci., 40: 1199 (1957)
4. Jensen R.G., Gander G.W. and Duthie A. H., 42: 1913 (1959) J. Dairy Sci., 42: 1913 (1959)
5. De Man J.M. J. Dairy Sci. 49: 343 (1966)
6. Hendrickx H., Huyghebaert A., Medelingen Rijksf. landbouw. Gent 33, 2, (1968)
7. Droste P.D., Ann. Fals. Exp. Chim. 701 - 229 (1972)
8. Naudet M., Pasero J., Biasini S., Rev. Fse Corps gras 12, 525 (1965)
9. Martin J.B., J. Am. Chem. Soc., 75: 5483 (1953)
10. "AOCS Methods of Analysis" Cd 11 - 57
11. Sahasrabudhe M.R., Legari J.J. and Mc Kinley W.P., J. Ass. Off. Anal. Chem. 49: 337 (1966)
12. Wood R.D., Raju P.K., Reiser R., J. Am. Oil Chemists' Soc. 42: 161 (1965)
13. Jensen R.G. and Morgan M.E., J. Dairy Sci. 42: 233 (1959)
14. Blum J. and Koehler W.R., Lipids, 5: 601 (1970)

IV. LES SUCROGLYCERIDES

1. Définition et propriétés

Les sucroglycérides sont des corps gras lipophiles, liposolubles, peu hydrophiles et insolubles dans l'eau. Ils sont stables en milieu neutre ou légèrement acide et hydrolysables en milieu nettement acide ou nettement alcalin. Leurs produits d'hydrolyse sont assimilables, nutritifs et non toxiques.

Ce sont des produits pâteux plus ou moins consistants suivant la nature de la graisse dont ils sont issus; selon les différents types, le point de fusion est de l'ordre de 47 à 62°C. Les sucroglycérides résultent de la transestérification d'un glycéride d'origine naturelle sur du saccharose. La transestérification est généralement conduite en présence d'un solvant et d'un catalyseur.

Le solvant le plus communément utilisé est la diméthyl formamide; son élimination a posé de sérieux problèmes, mais elle est réalisée actuellement de manière satisfaisante par lavages complexes successifs; on peut garantir une teneur maximale en D.M.F. du produit final inférieure à 50 p.p.m. (2). Les catalyseurs sont le plus souvent des sels de potassium ou de sodium qu'on élimine par lavage.

Le produit obtenu en fin de fabrication est un complexe de mono et diesters du saccharose et de mono et diglycérides en quantités variables selon les conditions opératoires, en particulier selon la température et les proportions de saccharose mises en oeuvre.

Diverses techniques d'estérification à haute température et en l'absence de solvant, d'esters de saccharose sont également étudiées (3).

En ce qui concerne les méthodes analytiques, une étude détaillée des méthodes de détermination et d'identification a été donnée par Roussos (4).

Des méthodes de dosage des différents sucroesters par photo-densitométrie après chromatographie sur couche mince ont été mises au point par Weiss et col (5).

Les sucroglycérides sont de remarquables émulsifiants des corps gras et ils trouvent une application immédiate dans de nombreuses industries alimentaires. Citons la biscotterie et la biscuiterie, la boulangerie et la pâtisserie industrielle, la chocolaterie, la confiserie, les glaces et crèmes glacées, la charcuterie, les graisses préparées dont les margarines et les shortenings, la fabrication d'aliments d'allaitement pour veaux et d'aliments pour bétail.

2. Les sucroglycérides comme traceurs

2.1. Etude toxicologique

Les sucroglycérides sont reconnus non toxiques à la suite de nombreuses études publiées dans les pays les plus divers (6) (7) (8) (9). Des études entreprises en alimentation animale sur des veaux ont été très favorables pour ces produits (10) (11) (12) (13). Les sucroglycérides sont fermentescibles, donc biodégradables, d'où leur intérêt comme agent surfactif au moment où l'industrie des détergents est confrontée avec des problèmes de pollution. L'autorisation de leur emploi par les législations européennes, en tant qu'additifs des produits alimentaires, se généralise, mais les teneurs maximales admises (de l'ordre de 1 à 2%) varient encore d'un pays à l'autre. La teneur maximale autorisée en DMF résiduaire est de 100 p.p.m. en France.

2.2. Etude économique

Le prix des divers sucroglycérides (suif, palme, saindoux) est de l'ordre de 1,3 U.C. le kg et peut donc être accepté en vue d'un "marquage" éventuel du "butter oil".

2.3. Etude analytique

Le contrôle des sucroglycérides peut être effectué suivant les méthodes préconisées par Roussos (4).

Les sucroglycérides sont constitués essentiellement de triglycérides non transformés, de diglycérides, de monoglycérides, de mono et diesters de saccharose, de légères proportions de sucre libre et d'acides gras.

A titre d'exemple, nous donnons selon le Provost (9) le résultat d'une analyse moyenne d'un sucroglycéride de suif.

Acides gras totaux	72,84%
Glycérol total	8,21%
Glycérol combiné	8,04%
Acides gras combinés	69,7%
Sucre combiné	17,7%
Sucre libre	1,25%
Humidité	1,13%

Les spécifications commerciales portent généralement sur le sucre combiné, le sucre libre, l'acidité libre, la teneur en D.M.F. (inférieure à 100 p.p.m.) et la coloration.

Les esters de saccharose peuvent être étudiés par chromatographie sur couche mince de gel de silice avec ^{le} solvant de développement toluène - acétate d'éthyle - éthanol à 95% (2.1.1.). Dans ces conditions, on obtient une séparation

convenable des mono, di et triesters de saccharose à partir d'une prise d'essai de 50 à 250 microgrammes. Les esters sont révélés par vaporisation d'une solution de 1 g d'urée, 4,5 ml d'acide phosphorique à 85% et 48 ml de n butanol saturé d'eau. Les plaques séchées à l'air puis à l'étuve à 110°C pendant 30 minutes sont examinées avec un photodensitomètre.

Par l'utilisation d'un facteur de conversion, on peut obtenir ainsi une analyse quantitative des esters de saccharose (5).

Dans les conditions habituelles de séparation sur plaque de gel de silice des glycérides partiels d'un corps gras, les sucroglycérides ne migrent pas et constituent après révélation un spot à l'origine. (Chap. 2 - III)

Ce spot contient également les composés lipidiques résiduels très polaires des lipides, tels les phosphatides et le glycérol et n'est donc pas représentatif des seuls saccharoglycérides. Cependant, ces composés sont en quantités très restreintes dans le "butter oil" et sont peu susceptibles de gêner la mise en évidence de quantités de l'ordre de 0,1% de sucroglycéride dans le beurre.

On peut obtenir une séparation des mono et diesters de saccharose par le développement par un mélange éther de pétrole - éther éthylique - éthanol 95% - acide acétique (50 - 50 - 10 - 2). Un tel mélange sépare correctement les mono et diesters de saccharose et les monoglycérides, mais les monoesters de saccharose et le glycérol migrent à peine de la ligne de base (Rf: 0,04).

3. Le "marquage" de la graisse de beurre

Le caractère particulier des sucroglycérides, composés issus de produits naturels, non toxiques et éminemment digestibles, leur polarité permettant une séparation globale par des techniques chromatographiques et leur disponibilité commerciale se révèlent des qualités intéressantes de traceur éventuel de la graisse de beurre et des expériences préliminaires ont montré qu'il était facile, par chromatographie sur couche mince de silice, de mettre en évidence un composé polaire particulier dans un "butter oil" additionné de 0,1% de sucroglycéride (Fig. 1).

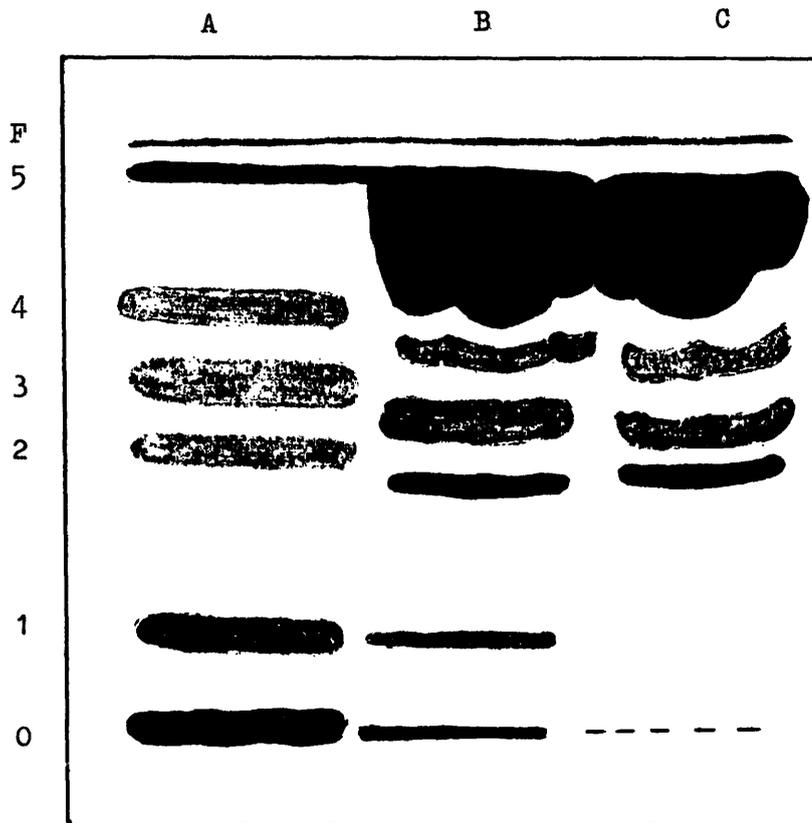
Cependant, les méthodes de dosage à ce niveau ne sont pas encore mises au point et la composition des produits commerciaux peut être assez variable, encore qu'on puisse la définir. Le contrôle du produit commercial lui-même est assez complexe.

Analytiquement, l'addition de 2% de sucroglycérides à un "butter oil" est susceptible de permettre un contrôle relativement simple du "marquage", quoique assez imprécis. On pourrait aussi mettre en évidence des quantités

Fig. 1 C.c.m. de gel de silice des sucroglycérides et des beurres

Ether de pétrole 60 - 80 - Diéthyléther-HAC (50 - 50 - 1,5)

Révélateur: 20% d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol



- A Sucroglycéride de palme (1 mgr)
- B Beurre + 2% sucroglycéride (5 mgr)
- C Beurre normal (5 mgr)

- 0 Esters de saccharose, glycérol, phosphatides
- 1 Monoglycérides
- 2 1 - 2 diglycérides
- 3 1 - 3 diglycérides
- 4 Acides gras
- 5 Triglycérides
- F Front du solvant

beaucoup plus réduites correspondant à la dilution d'environ 5% de "butter oil" tracé dans une graisse normale, mais un test spécifique, suffisamment simple et précis pour le contrôle courant doit encore être mis au point.

4. Elimination des sucroglycérides des graisses

Une des qualités essentielles des sucroglycérides dans les produits alimentaires, leur dégradabilité conduisant à l'obtention par hydrolyse de produits assimilables, nutritifs et non toxiques, est en fait, un grave défaut pour un traceur.

Les sucroglycérides étant hydrolysables en milieu très acide ou plus rapidement encore en milieu alcalin, surtout à température élevée, il sera possible et même assez facile de les éliminer d'un corps gras.

En effet, on peut réaliser dans la masse de graisse à examiner des conditions propices à l'hydrolyse, puis enlever le saccharose par lavage à l'eau et les acides libres par neutralisation alcaline ou désodorisation à la vapeur sous vide.

Même en faisant abstraction des techniques industrielles rendant l'élimination possible, les sucroglycérides présents dans un beurre acide seront soumis à une hydrolyse lente et continue et ils constitueront un foyer de fermentation par des microorganismes au sein de la matière grasse, celle-ci risquant de s'altérer beaucoup plus rapidement.

Conclusions

Dans l'état actuel, et en tenant compte des progrès récents dans ce domaine (sucroglycérides résistant à des pH de 3 à 3,5), il ne semble pas que les sucroglycérides puissent être retenus comme traceurs acceptables pour une matière grasse. Sans doute, les obstacles analytiques pourraient-ils être rapidement surmontés, de manière à permettre au moins l'utilisation d'un test relativement simple; cependant, il reste à obtenir un composé suffisamment stable dont la résistance à l'hydrolyse soit affermie sur le plan industriel.

2-2-IV Bibliographie

1. Audidier J. et Lepape A., Bul. du C.T.U. des biscuiteries et biscottes - n° 4 - (1964)
2. Loiseau B., Ann. des Fals. et de l'Exp. chim. 656 - 657 - 221 (1963)
3. Feuge R.O., Zeringue H.J., Weiss T.J. and Brown M., J.A.O.C.S., 47, 56 (1969)
4. Roussos M., Parf. Cosm. et Savons 4 - 355 -(1961)
5. Weiss T.J., Brown M., Zeringue H. J. and Feuge R.O., J.A.O.C.S., 48, 145 (1970)
6. Chiancone F., Mosinger M., Tudisco R. et Roussos M., Ann. des Fals. et de l'Exp. chim. 656 - 657 - 193 (1963)
7. Oshima M., Kajiwara K., Takeda Kenk. Nempo 19 - 172 (1960)
8. Tudisco R., Boll. Soc. ital. Biol (1963)
9. Passedouet H., Industr. Alim. Agr. 81, 705 (1964)
10. Le Provost F., "Les saccharoglycérines", Thèse - Ed. Bosc Frères Lyon 42, Quai Gailleton (1965)
11. Wise M.B., Haskins B.R., Barrick E.R. and Blumer T.N., Scient. Newsletter 47, 33 (1965)
12. Ladrat J. et Jousselin W., Bull. Acad. Vétér. - 10 - 497 (1965)

V. LES PHOSPHATIDES

1. Définition - Propriétés

Les phosphatides sont des corps lipidiques formés par substitution d'un radical acyle (-CO-R) par l'acide phosphorique, lui-même étant saturé par un groupe basique.

Ils jouent un rôle important dans la physiologie cellulaire animale et végétale. On les rencontre à des taux divers dans toutes les matières grasses alimentaires.

Ils se divisent en nombreuses classes et on adopte généralement la classification suivante (1):

A) Glycérophosphatides

I Esters

- a) Lécithine (phosphatidylcholine, sol. dans l'alcool)
- b) Céphaline (insol. dans l'alcool)
 - 1. Phosphatidyl éthanolamine
 - 2. Phosphatidyl sérine
 - 3. Phosphatidyl inositol
 - 4. Phytoglycolipides
- c) Polyglycérophosphatides
- d) Lysophosphatides

II Acétal phosphatides (plasmalogènes)

B) Sphingomyéline

C) Bactériophosphatides

D) Autres phosphatides

Les principaux phosphatides (esters de glycérol) se rencontrent aussi bien dans les produits végétaux qu'animaux, mais les proportions sont souvent nettement différentes (2).

Les phosphatides du lait sont principalement de la phosphatidylcholine (33%), de la phosphatidyl éthanolamine (29%), de la phosphatidyl sérine (10%) et de la sphingomyéline (19%) (3).

Le lait contient 0,3 à 0,4 gr de phospholipides par litre tandis que le beurre en contiendrait 1,7 à 2,5 mg/kg (4).

La teneur en phosphatides du lait varie suivant les saisons. Elle est maximale en hiver et minimale en été (5).

Les phospholipides de la graisse butyrique ne contiennent pas d'acides inférieurs à 12 atomes de carbone. Ils sont notablement plus riches en acides poly-

insaturés que les triglycérides (6).

2. Les phosphatides comme traceurs

Les phosphatides commerciaux sont généralement des lécithines.

Les lécithines sont utilisées dans le traitement industriel des corps gras comme émulsifiants, antioxydants et lubrifiants.

Les principales lécithines commerciales sont des lécithines de soya et des lécithines d'oeuf. Ces produits contiennent généralement 60 à 65% de phosphatides, 30% d'huile et des stérols.

Les spécifications commerciales concernent le taux minimum d'insoluble dans l'acétone (62 ou 65%), le taux maximum d'humidité et d'insoluble dans le benzène, l'acidité et la coloration.

Les lécithines ont un caractère d'émulsifiant hydrophile.

Leur utilisation en tant que tel est autorisée dans les corps gras par les législations européennes et il ne semble pas qu'il pourrait y avoir de réticences biologiques ou économiques à leur emploi éventuel comme traceur.

Cependant, du point de vue analytique, le dosage des phosphatides et des lécithines en général reste une opération très complexe.

En outre, la déémulsionnement des corps gras est une opération industrielle de raffinage qui consiste à éliminer de ceux-ci les phosphatides et d'autres impuretés mal définies.

La déémulsionnement effectuée sur les corps gras destinés à un usage alimentaire est presque toujours obtenue dans l'industrie par hydratation des phosphatides, afin de les rendre insolubles dans l'huile.

La déémulsionnement des huiles brutes réduit presque à néant le taux des phosphatides. C'est une opération relativement simple qui pourrait être réalisée sur la graisse de beurre additionnée de lécithine.

Le caractère hydrophile des phosphatides et le fait que ceux-ci sont liés de manière complexe aux protéines, provoquent d'ailleurs leur élimination en quantité considérable dans le babeurre lors du barattage du beurre. En effet, si les phosphatides sont présents dans la graisse de lait à une teneur moyenne de l'ordre de 1% de la matière grasse, on en retrouve environ 0,2% dans le beurre lui-même (7) (8) (9) (10) (11). Cependant, si on fond avec précaution (en dessous de 50°C) le beurre, la quasi totalité des phospholipides se retrouve dans le sérum et les méthodes de dosage des phosphatides dans le beurre peuvent négliger la fraction demeurant dans la phase grasse.

Les méthodes de détermination des phosphatides totaux dans les graisses sont en général basées sur la détermination de la teneur en phosphore. Celui-ci est dosé colorimétriquement après formation du complexe bleu du phosphomolybdate (12). On utilise un facteur d'analyse pour calculer la teneur en phosphatides à partir de la teneur en phosphore.

L'extraction des phosphatides réclame l'utilisation de mélanges de solvants polaires et non polaires et de nombreux systèmes sont proposés dans la littérature (13).

L'analyse qualitative des différents extraits peut être réalisée par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les solvants les plus généralement employés sont des mélanges de chloroforme, de méthanol et d'eau en milieu acide (ac. acétique) ou basique (ammoniaque) (15) (16) (17) (18). Les analyses les plus complètes des phospholipides du lait seront effectuées par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (19) (20).

En fait, à cause de leur élimination quasi complète des graisses par des procédés simples et à cause de la complexité de leur analyse, les phosphatides ne sauraient être considérés comme traceurs acceptables pour le beurre et surtout pour la graisse de beurre.

2-2-V Bibliographie

1. Deuel H.J., The lipids - Their Chemistry and Biochemistry - Bd. I - III
Interscience Publishers, Inc. New York (1957)
2. Wagner H. und Wolff P., Fette Seifen Anstrichmitteln 66 - 425 (1964)
3. Rhodes D.N. and Lea C.H., J. Dairy Res. 25, 60 (1958)
4. Deutch A., Mattson S., Swartling (P.), Milk and Dairy Research Alnarps Report,
n° 54 (1958)
5. Holdern T.F., Aceto N.C., Dellamonica E.S. and Calhoun M.J., J. Dairy Sci. 49 -
346 (1966)
6. Badings H.T., Neth. Milk and Dairy J. 16 - 217 (1962)
7. Koops J., Neth. Milk and Dairy J. 11 - 43 (1957)
8. Koops J., Neth. Milk and Dairy J. 12 - 226 (1958)
9. Holm G.E., Wright P.A. and Deysher E.F. 29 - 631 (1936)
10. Mc Dowell A.K., J. Dairy Res. 24, 192 (1957)
11. Baliga B.S. and Basu K.P., Indian J. Dairy Sci. 9, 95 (1956)
12. D.G.F. Methode C - VI 4 (61) A.O.C.S. Official Method Ca 12-55
13. Wittcoff H., The phosphatides - New York: Reinhold Publishing Corp. 1951
14. Parker F. and Peterson N.F., J. Lipid Res. 6, 455 (1965)
15. Skipski V.P., Peterson R.F. and Barclay M., Biochem. J. 90, 374 (1964)
16. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A., Simon G., Galli C. and Bauman A.,
Methods of enzymology, Vol. 14, 272 - New York: Academic press (1969)
17. Siakotos A.N. and Rouser G., J. Am. Oil Chemists' Soc. 42, 913 (1965)
18. Kuzdzal - Savoie S., Ann. Nutr. Alim. 25 - A 225 (1971)
19. Skipski V.P., Peterson R.F., Sanders J. and Barclay M. , J. Lipid Res. 4, 227
(1963)
20. Skidmore W.D. and Entenman C., J. Lipid Res. 3, 471 (1962).

VI. LES PHYTOSTEROLS: LE STIGMASTEROL.

Les stérols des corps gras alimentaires

Les stérols sont des composés à noyau cyclopenténophénanthréni- que possédant une fonction alcool secondaire, présents dans tous les corps gras alimentaires.

On sait que les graisses animales, dont le beurre, contiennent pratiquement exclusivement du cholestérol ou 5 cholestène 3β ol, tandis que les huiles végétales contiennent très rarement du cholestérol en quantité toujours réduite, celui-ci étant remplacé par des composés de structures très voisines, les phytostérols, dont les éléments principaux sont le sitostérol (bêta et gamma), le campestérol, le stigmastérol, le brassicastérol et le 7 stigmastérol.

Le cholestérol et les phytostérols présentent sensiblement les mêmes réactions chimiques, mais leurs propriétés physiques sont suffisamment différentes que pour permettre des séparations convenables par des méthodes de chromatographie. La différence entre zoostérols et phytostérols n'est pas si hermétique qu'on aurait pu le croire il y a quelques années, beaucoup d'huiles végétales contenant des taux mineurs de cholestérol et certaines graisses animales contenant des taux mineurs de sitostérol ou de brassicastérol.

La graisse de beurre contiendrait en moyenne 0,3% de stérols totaux, parmi lesquels 99% de cholestérol, du lanostérol et du déhydrolanostérol en quantités inférieures à 1%⁽¹⁾ et même des traces de bêta sitostérol, soit un peu moins de 0,1% (2) (3).

Le bêta sitostérol est le principal des stérols végétaux. Sous-produit de diverses industries et préparé parfois pour des usages pharmaceutiques, son prix de revient n'est pas tellement élevé; il est possible de l'obtenir rapidement dans le commerce à un haut degré de pureté.

Soluble dans les corps gras, non éliminable au raffinage et déterminable analytiquement en très faibles quantités grâce aux techniques de chromatographie gazeuse, il est considéré comme un très bon traceur des corps gras animaux et est utilisé en tant que tel dans la Communauté Economique Européenne.

Cependant, les méthodes de détermination analytique du bêta sitostérol par chromatographie permettent la détermination simultanée des autres stérols.

Si le sitostérol a été choisi, le premier parmi les phytostérols, comme traceur du beurre, en raison principalement d'une disponibilité commerciale immédiate, il est incontestable qu'analytiquement au moins, d'autres phytostérols, et en particulier le stigmastérol commercialement disponible, pourraient constituer des traceurs parfaitement valables.

Le stigmastérol

1. Choix du traceur

Le choix du traceur, comme il a été rappelé au début de ce rapport, doit toujours reposer sur des critères biologiques, économiques et analytiques.

1.1. Le problème biologique

Biologiquement, les stérols sont des produits naturels présents dans tous les corps gras alimentaires et ils sont consommés avec ceux-ci par toute la population. Si le problème de l'influence néfaste des régimes riches en cholestérol est controversé, ce problème ne se pose pas en matière de régimes riches en phytostérols. D'autre part, les taux de traceurs qui pourraient être prévus en vue du "marquage" des beurres, sont dérisoires et ne pourraient apporter aucune modification sensible à la quantité de stérols absorbés par les consommateurs de beurres tracés. Il n'existe aucun motif biologique pour qu'on ne puisse utiliser les différents phytostérols comme traceurs de la graisse butyrique, si ceux-ci doivent être absorbés en quantités comparables aux taux de sitostérols déjà utilisés à cet effet.

1.2. Le problème économique

Les phytostérols disponibles sur le plan commercial avec un grand degré de pureté semblent être uniquement les sitostérols et le stigmastérol. Ces deux stérols sont extraits de produits végétaux et on ne les produit pas commercialement par synthèse.

Le choix d'un traceur du beurre parmi la classe des phytostérols se limite donc actuellement aux sitostérols et au stigmastérol. Les sitostérols étant déjà utilisés, il nous reste à examiner le cas du stigmastérol et de comparer éventuellement les avantages et les inconvénients de chaque produit en tant que traceur de la graisse butyrique.

Le bêta sitostérol était commercialement disponible, pour une pureté supérieure à 90%, à un prix approximatif de 15 U.C. par kg (4). Le stigmastérol, avec une pureté garantie supérieure à 95% serait livré à un prix commercial approximatif de 50 U.C. le kg; il coûterait donc environ trois fois plus cher.

Cette différence de prix constitue un handicap énorme pour l'emploi du stigmastérol, à moins que celui-ci puisse être utilisé à des doses trois fois moindres que ne l'était le bêta sitostérol, tout en conservant la même efficacité analytique au dépistage.

1.3. Le problème analytique

La chromatographie gazeuse des stérols ou de leurs dérivés constitue la méthode analytique la plus judicieuse et la plus efficace de détermination de la composition des stérols extraits d'un corps gras, mais des indications intéressantes peuvent être apportées par des méthodes plus simples.

En raison de la composition naturelle des stérols des beurres et des corps gras, ce sont le cholestérol et les sitostérols qui sont les plus aisément déterminables par chromatographie gazeuse, ensuite viennent le Δ 7 stigmastérol, le brassicastérol, enfin le campestérol et le stigmastérol qui ont des temps de rétention très proches en chromatographie gazeuse. Outre le cholestérol, le beurre contient des traces de sitostérol, du lanostérol, de l'ergostérol, peut-être du campestérol, mais ne paraît pas contenir du stigmastérol; du moins le taux éventuel de celui-ci n'excéderait certainement pas 10% du taux de sitostérol et un pic à l'endroit prévu pour le stigmastérol n'apparaît pas sur les chromatogrammes des stérols des beurres.

En conséquence, si la détermination quantitative du taux de stigmastérol dans un mélange de stérols est souvent imprécise en raison d'une séparation non suffisante sur colonne normale des pics du campestérol et du stigmastérol, la simple mise en évidence de traces de stigmastérol additionné à un beurre peut être plus facile que la mise en évidence d'un taux identique de sitostérol additionné au même beurre.

Sur le plan analytique, la présence de traces de stigmastérol constitue donc un test meilleur de la présence d'une anomalie dans une graisse butyrique que la présence de traces de sitostérol. Cependant, le sitostérol est plus aisément déterminable quantitativement par chromatographie gazeuse sous forme de traces que le stigmastérol.

2. Le stigmastérol: définition et propriétés générales

Le stigmastérol est le Δ 5, 22 - stigmastadiène 3 β ol de formule brute $C_{29}H_{48}O$. Son point de fusion est de l'ordre de 170°C, un peu plus élevé que celui du cholestérol (148°C.) et que celui du bêta sitostérol (137°C.). Le point de fusion de l'acétate de stigmastérol est de l'ordre de 144°C, considérablement plus élevé que celui du cholestérol (115°C.) et même que celui du β sitostérol (126°C.). On peut donc s'attendre à ce que les mélanges d'acétates de stérols riches en stigmastérol aient des points de fusion relativement plus élevés que les mélanges d'acétates où le stigmastérol serait absent ou peu représenté.

En pratique cependant, la mesure du point de fusion d'un mélange d'acétates de sté-

rols n'est pas quantitativement liée aux diverses proportions des constituants du mélange, ni à leurs points de fusion respectifs, comme on le constate lors de la mesure des points de fusion des acétates isolés à partir de diverses huiles végétales.

Le stigmastérol possédant une double liaison en chaîne latérale (C22) est d'ailleurs moins stable que les sitostérols ou que le campestérol. Cette double liaison peut être partiellement hydrogénée lors de l'hydrogénation des corps gras, alors que la double liaison à l'intérieur de l'anneau n'est pas touchée. L'hydrogénation de la double liaison en chaîne latérale du stigmastérol conduit à la formation de sitostérol. Cependant, même une hydrogénation totale des acides insaturés des glycérides telle qu'on la pratique industriellement pour l'obtention de stéarines, ne conduit pas à la disparition du stigmastérol.

3. Les stigmastérols commerciaux

3.1. Spécificités commerciales

Des stigmastérols commerciaux nous ont été fournis par la firme américaine (U.S.A.) Upjohn. Le produit est d'origine végétale et est obtenu par extraction de l'huile de soya, huile dont la production est énorme en Amérique et qui est très riche en stigmastérol.

Les stérols de soya sont des produits résiduels de l'huilerie dont on extrait le stigmastérol par des méthodes de cristallisation à contre-courant (5) dans des solvants appropriés: le stigmastérol est préparé en vue de la synthèse d'hormones stéroïdes, telles la progestérone, la cortisone et ses dérivés. Le procédé d'extraction conduit à une pureté approximative de 97% en stigmastérol et la pureté moyenne annoncée par la firme pour le produit commercial est d'environ 95%.

Les impuretés principales sont le bêta sitostérol (3%), le campestérol (1,3%) et le brassicastérol (0,7%).

3.2. Contrôle des stigmastérols commerciaux

	Indications de la firme	Nos essais	Littérature
Point de fusion (Büchi - Tottoli)	165°C	167 à 168°C	168 - 170°C
Point de fusion des acétates	-	143 - 144°C	144°C
Teneur en eau	1%	0,1%	-
Titre en stérols totaux	-	Ca 100%	-
Chromatographie gazeuse des stérols			
Stigmastérol	Ca 95%	95,1%	
Sitostérol	3%	2,8%	
Campestérol	1,3%	1,4%	
Brassicastérol	0,7%	0,6%	

La pureté des stigmastérols commerciaux reçus est donc bien celle annoncée par la firme. En pratique, on peut la considérer comme égale à 95% en stigmastérol.

4. Méthodes analytiques de détermination du stigmastérol dans la matière grasse.

Ces méthodes sont celles utilisées en général pour les stérols de la graisse butyrique, soit en premier lieu, l'isolement des stérols par précipitation à la digitonine dans l'insaponifiable ou dans le corps gras lui-même à partir des digitonides, à l'état pur ou sous forme de dérivés, enfin, l'analyse de certaines propriétés physiques des mélanges de stérols ou de leurs dérivés (point de fusion) et la séparation des stérols ou de leurs dérivés avec analyse quantitative par des techniques chromatographiques.

Des techniques analytiques de détermination des stérols sont actuellement normalisées (F.I.L. - A.O.A.C.) (5) (6) (7). Ces méthodes ont été conçues dans l'intention première de mettre en évidence les falsifications de la matière grasse butyrique par addition de graisses d'origine végétale.

Nous en rappelons les grands principes:

- a) dosage des stérols totaux par pesée du complexe à la digitonine;
- b) recherche des phytostérols par l'accroissement de la mesure du point de fusion des acétates de stérols;
- c) analyse qualitative des stérols ou de leurs dérivés par chromatographie en couche mince ou par chromatographie gazeuse.

4.1. Le dosage des stérols totaux (6)

Ce dosage est effectué suivant la méthode F.I.L. 32 - 1965. Lorsqu'on tient compte du facteur moyen d'analyse de 0,25 pour le rapport du poids moléculaire des stérols à leurs digitonides (facteur légèrement trop élevé pour le cholestérol), la teneur en stérols totaux de la graisse de beurre est en moyenne de 0,30 à 0,32%. Pour une matière grasse butyrique normale, nous n'avons jamais observé de valeurs supérieures à 0,34% et très rarement des valeurs inférieures à 0,27%.

Cependant, on sait que le taux de stérols peut varier suivant les divers traitements que peuvent subir les matières grasses. Les processus de désodorisation à haute température peuvent réduire de 25% voire davantage le taux des stérols totaux des matières grasses traitées.

La mesure de la teneur en stérols n'en constitue pas moins une indication très précieuse qu'on aurait tort de négliger lorsque l'on recherche la présence de phytostérols parmi les stérols du beurre.

4.2. Le point de fusion des acétates de stérols

Etant donné que le point de fusion de l'acétate de stigmastérol (144°C) est considérablement plus élevé que le point de fusion de l'acétate de cholestérol (114 - 115°C), l'addition de quantités suffisantes de stigmastérol dans le beurre peut être soupçonnée par la mesure d'un point de fusion anormalement élevé des acétates de stérols.

Cependant, la mesure du point de fusion d'un produit non absolument pur est difficile à réaliser dans la pratique avec une précision qui dépasse 0,5°C.

Si le point de fusion des acétates de stérols d'un beurre dépasse 115°C, il y a cependant de fortes présomptions de la présence de phytostérols. On considère généralement que ces présomptions se muent en certitudes quand le point de fusion atteint 117°C. Ceci est confirmé par l'examen microscopique des cristaux de stérols (6).

4.3. Analyse qualitative des stérols (7) (8).

Plusieurs méthodes d'analyse qualitative des stérols ont été mises au point.

La chromatographie gazeuse s'est rapidement révélée la meilleure; elle est en effet beaucoup plus sensible que la chromatographie en couche mince et se prête mieux à des analyses quantitatives. La chromatographie gazeuse est réalisée directement sur les stérols libérés des digitonides dans un solvant suffisamment polaire ou sur les dérivés (triméthyl silyl-éthers ou acétates).

La chromatographie gazeuse des dérivés des stérols permet d'obtenir une séparation meilleure que celle des stérols purs, ce qui apporte une sensibilité plus grande à l'analyse quantitative. Les acétates étant préparés pour la mesure du point de fusion et pouvant être facilement purifiés et enrichis en phytostérols par cristallisations successives, leur utilisation s'impose ici à celle des dérivés triméthylsilylés.

5. Le "marquage" du beurre par le stigmastérol

5.1. Analyse qualitative du stigmastérol commercial par chromatographie gazeuse

Le stigmastérol commercial que nous avons utilisé pour procéder à des essais de "marquage" du beurre a été analysé par chromatographie gazeuse directe d'une solution étherée et par chromatographie gazeuse des acétates

Les modalités analytiques étaient les suivantes:

Appareil: aerograph 1520
Colonne: acier inox: 2 m - 3 mm;
phase stationnaire: SE 52, 4%;
support: aeropak 30 - 100 - 120 mesh;
température: 245°C (stérois) et 255°C (acétates).
DéTECTEUR: F.I.D., 300°C.
Injecteur: 300°C.
Vol. injecté: 5 microlitres (solution à 5% dans l'éther)
Gaz vecteur: azote; débit: env. 40 ml/minute.

Dans ces conditions, les temps de rétention relatifs par rapport au temps du cholestérol sont les suivants:

	<u>Stérois (Fig. 1)</u>	<u>Acétates (Fig. 3 et 4)</u>
Cholestérol	1	1
Brassicatérol	1,14	1,11
Campestérol	1,33	1,27
Stigmastérol	1,45	1,37
Sitostérol	1,67	1,60

Le stigmastérol commercial utilisé contenait effectivement 95% de stigmastérol et 5% d'autres stérois végétaux. Les composés non stéroïdes sont négligeables (3 - 2).

5.2. Choix du taux de traceur

5.2.1. Taux à préconiser en fonction de la mesure du point de fusion des acétates.

Le taux de traceur qu'il serait souhaitable de préconiser en vue d'un "marquage" éventuel des beurres sera finalement choisi en fonction de la sensibilité permise par les méthodes analytiques. Il est nécessaire de considérer en premier lieu la méthode la plus simple, c'est-à-dire le dosage des stérois totaux et la mesure du point de fusion des acétates de stérois.

Nous avons réalisé différents "marquages" expérimentaux de "butter oils" par des taux décroissants de stigmastérol, dosé les stérois totaux et mesuré les points de fusion des acétates. On a tenu compte de la pureté moyenne de 95% en stigmastérol du produit commercial.

Fig. 1: Chromatographie gazeuse des stérols
Stigmastérol "UPJOHN"

1	Brassicastérol	0,6%
2	Campestérol	1,4%
3	Stigmastérol	95,1%
4	Sitostérol	2,8%

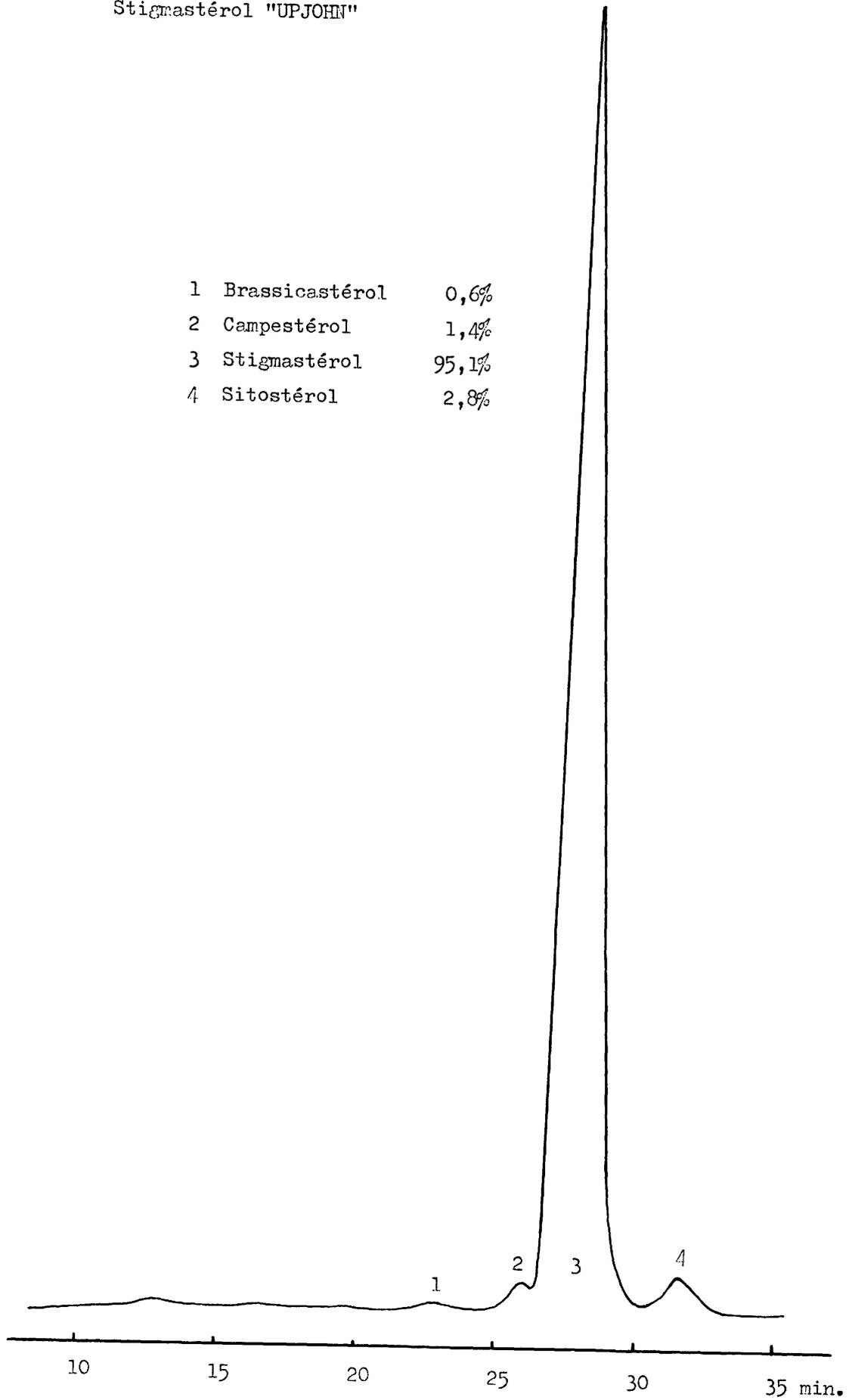


Fig. 2: Chromatographie gazeuse des acétates de stérols
Beurre normal

1 Cholestérol	Attén: x 64
2 Campesterol?	" x 1
3 Sitostérol	" x 1

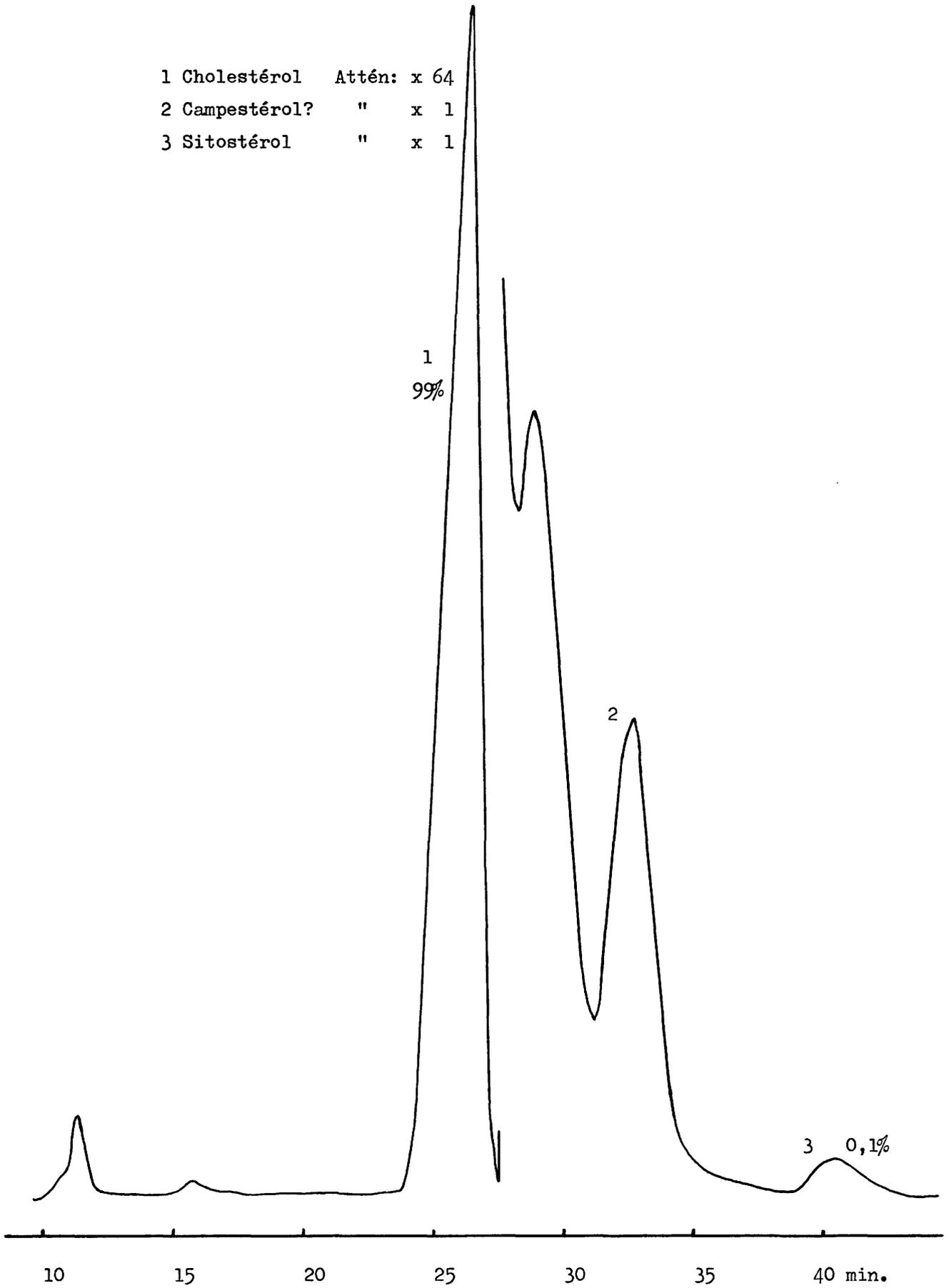


Fig. 3: Chromatographie gazeuse des
acétates de stérols
Beurre tracé par 250 gr de
stigmastérol/tonne

1	Cholestérol	Attén: x 64
2	Campestérol	" x 8
3	Stigmastérol	" x 8
4	Sitostérol	" x 8

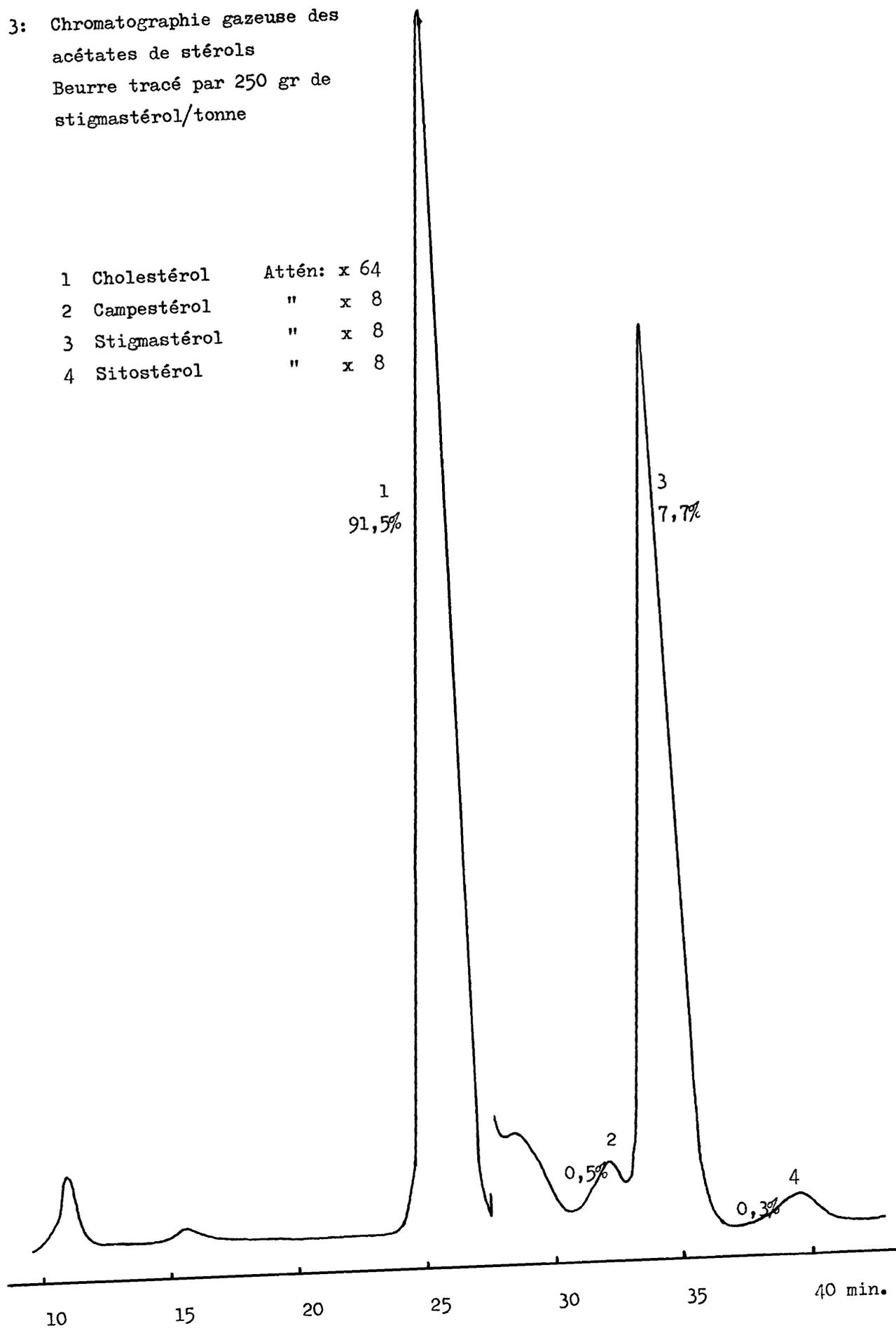
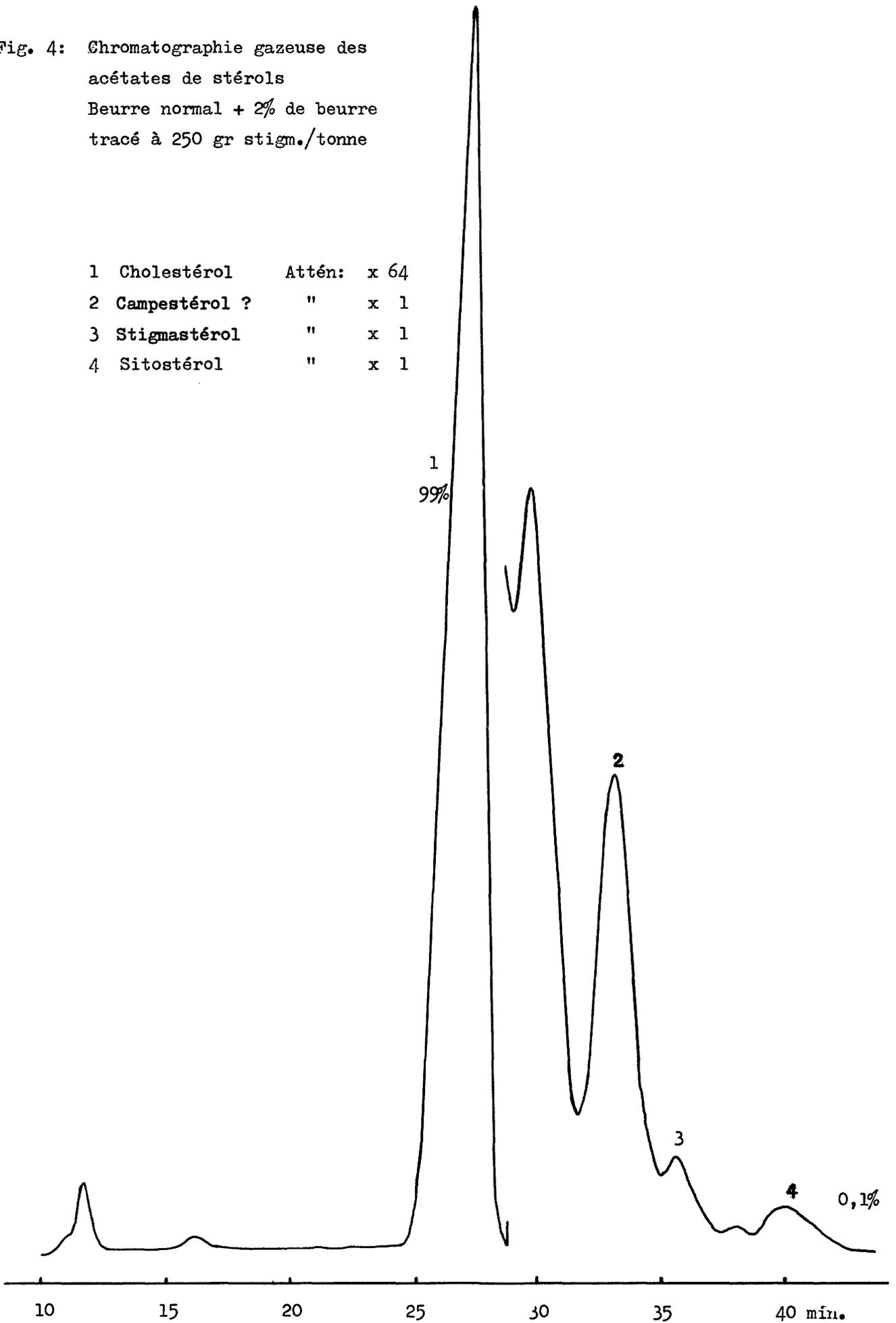


Fig. 4: Chromatographie gazeuse des
acétates de stérols
Beurre normal + 2% de beurre
tracé à 250 gr stigm./tonne

1	Cholestérol	Attén:	x 64
2	Campestérol ?	"	x 1
3	Stigmastérol	"	x 1
4	Sitostérol	"	x 1



Les résultats suivants ont été obtenus:

"Butter oil" marqué par	Stérols totaux	Point de fusion des acétates 2 cristallisations
500 gr stigm. pur / tonne (526 gr stigm. commercial)	0,36%	119,5°C
300 gr	0,34%	117,6°C
250 gr	0,34%	117,2°C
200 gr	0,33%	116,8°C
150 gr	0,32%	116,5°C
100 gr	0,32%	116 °C
50 gr	0,31%	115,2°C
0 gr	0,305%	114,6°C

Pratiquement, des résultats qui conduisent à la conclusion certaine d'une anomalie dans la composition des stérols n'apparaissent qu'aux concentrations en traceurs supérieures à 200 grammes/tonne. Cependant, des indications fort précieuses apparaissent déjà pour des taux de 50 gr. par tonne et surtout pour des taux de 100 grammes/tonne.

Si on veut se baser sur la mesure des points de fusion des acétates de stérols comme méthode rapide d'orientation permettant de séparer les beurres suspects ou fraudés des beurres normaux, nous considérons comme nécessaire de préconiser comme quantité minimum à ajouter au beurre la dose de 250 gr de stigmastérol/tonne de "butter oil".

Les acétates de stérols préparés à partir des beurres "marqués" suivant cette dose peuvent toujours subir deux ou trois cristallisations successives amenant le point de fusion à 117°C et presque toujours la teneur en stérols totaux sera supérieure à 0,32%.

Des indices de composition anormale des stérols (point de fusion des acétates après deux cristallisations supérieur à 115°C) apparaissent dès qu'on ajoute 20% de beurre tracé à 250 gr stigmastérol/tonne à un beurre normal.

On constate donc que la mesure du point de fusion des acétates de stérols est loin de donner entière satisfaction, même pour une méthode d'orientation, puisqu'elle est susceptible de ne pas retenir les beurres qui seraient additionnés par moins de 20% de beurre tracé.

Pour des raisons économiques, le prix du stigmastérol étant trois fois plus élevé que celui du bêta sitostérol, nous estimons qu'il est difficile de dépasser la quantité de 250 grammes de stigmastérol par tonne comme dose de traceur préconisable en vue d'un "marquage" des beurres.

5.2.2. Choix en fonction de l'analyse en chromatographie gazeuse

(Fig. 2 - 3 - 4)

Nous avons considéré qu'une bonne méthode analytique doit rendre possible la détermination de 2% d'un beurre tracé dans un beurre normal. En fonction de ce critère, des mélanges de beurres normaux et de beurres tracés à 250 grammes de stigmastérol par tonne ont été réalisés; les acétates de stérols ont été préparés et séparés par chromatographie gazeuse suivant la technique décrite au chapitre 5.1.

Mélange	% Stigmastérol	% Cholestérol	Stigmastérol X 100
	2 cristallisations par chromat. gaz.	par chromat. gaz.	Cholestérol
Beurre Normal: B.N.	0		0
B.N. + 1% beurre tracé	traces	99,3	0,1
B.N. + 2% beurre tracé	traces	99	0,1
B.N. + 5% beurre tracé	0,1	99	0,1
B.N. + 10% beurre tracé	0,7	98,6	0,75
B.N. + 20% beurre tracé	1,5	97,7	1,54
B.N. + 50% beurre tracé	4,1	95,2	4,30
Beurre tracé	7,7	91,5	8,42

Les chromatogrammes en figure 3 et 4 montrent une différence nettement perceptible à l'endroit attendu pour le pic du stigmastérol. L'addition à un beurre normal de 2% d'un beurre tracé par 250 gr de stigmastérol/tonne peut donc être facilement mise en évidence par chromatographie gazeuse des acétates de stérols. Même des additions inférieures à 1% seraient encore perceptibles. Il faut noter cependant qu'il est nécessaire de disposer de colonnes à nombre suffisant de plateaux théoriques et que la mesure quantitative du stigmastérol devient très relative en dessous du taux de 1%, et ne permettrait pas une appréciation correcte d'une fraude légère.

On peut toutefois considérer que, même si la dose de traceur était ramenée à 200, voire 150 grammes de stigmastérol par tonne, elle serait suffisante pour que la méthode d'analyse en chromatographie gazeuse permette un contrôle efficace.

Remarque importante.

Il est important de bien diluer les stérols dans la graisse butyrique à tracer et de rendre cette dilution homogène. Afin d'obtenir une homogénéisation suffisante du mélange, il est nécessaire d'effectuer un concen-

tré de stigmastérol à température relativement élevée, de préférence entre 60 et 80°C, dans du "butter oil" et de disperser celui-ci à chaud dans la masse à tracer. Le stigmastérol, davantage que le bêta sitostérol pose des problèmes pratiques en vue de sa répartition homogène dans le "butter oil". En partie à cause de ces difficultés d'ailleurs, et parce que l'analyse quantitative devient précaire lorsque les taux de stigmastérol sont minimes, nous considérons qu'il est contre-indiqué de descendre le taux de stigmastérol qu'on pourrait préconiser pour "marquer" la graisse butyrique en dessous de 200 grammes/tonne.

6. Elimination du stigmastérol de la graisse butyrique

Le stigmastérol comme les autres stérols, dont le bêta sitostérol, n'est pas économiquement extractible des beurres tracés. Un traitement thermique énergique pourrait peut-être en détruire une partie, mais ce traitement ne pourrait se faire sans altérer les autres stérols et la matière grasse elle-même. Il est important de signaler cependant que la molécule de stigmastérol est moins stable à la chaleur que celle du cholestérol ou que celle des sitostérols. Le "stripping" ou désodorisation des matières grasses par la vapeur sous vide poussé, réduit quelque peu la teneur en stérols des matières grasses. Cependant, la sévérité des conditions du "stripping" paraît limitée pour les matières grasses animales, et on ne peut guère dépasser une température de 200°C avec une pression inférieure à 1 mm de mercure dans le cas de la graisse butyrique. Dans ces conditions, le "stripping" n'enlève pas plus de 15 ou 20% des stérols totaux. Pour les huiles végétales, il semblerait que la teneur en stigmastérol parmi les stérols des échappées de désodorisation serait supérieure à la teneur en stigmastérol des produits soumis à la désodorisation (10), mais nous n'avons pu confirmer ce fait pour les beurres "marqués". Il est en tout cas certain que le "stripping" à 190°C sous pression de 1 mm de mercure a tendance à réduire le taux de stigmastérol parmi les stérols totaux du produit traité, celui-ci se décomposant plus facilement que les autres stérols; toutefois, cette réduction est très relative et dépend des modalités du traitement.

A cet égard, le stigmastérol n'est certainement pas un meilleur traceur que le bêta sitostérol, mais on ne peut pas considérer qu'il est sensiblement moins bon.

7. L'emploi du stigmastérol comme traceur de la matière grasse butyrique et la mise en évidence des corps gras d'origine végétale.

L'addition au beurre de stigmastérol comme traceur, pourrait-elle masquer l'ad-

dition de graisses d'origine végétale? Certainement non, car si la plupart des huiles végétales contiennent du stigmastérol, les taux sont généralement moins importants que ceux des autres stérols et, en tout cas, beaucoup moins élevés que ceux du bêta sitostérol. En conséquence, une fraude par addition au beurre de graisse végétale se marque premièrement par une augmentation anormale du taux de sitostérol qui est toujours de loin supérieur au taux de stigmastérol, tandis qu'une fraude par addition de beurre tracé au stigmastérol, ne se voit pratiquement pas par l'augmentation du taux de sitostérol, très peu représenté dans le stigmastérol commercial. S'il y a falsification d'un beurre par addition intentionnelle de plus de 2,5% de beurre tracé à 250 grammes de stigmastérol par tonne, le rapport stigmastérol/sitostérol sera toujours supérieur à 1.

8. L'utilisation comparée du bêta sitostérol et du stigmastérol en tant que traceurs de la graisse butyrique

8.1. Point de vue commercial

	Sitostérol	Stigmastérol
Prix approximatif/kg	15 U.C.	52 U.C.
Pureté commerciale	supérieure à 90%	95%

8.2. Point de vue analytique

8.2.1. Mise en évidence du "marquage" par la détermination du point de fusion des acétates de stérols.

a) Doses nécessaires à la mise en évidence après deux cristallisations	150 gr/tonne	150 gr/tonne
b) Doses contribuant à la mise en évidence d'une anomalie par augmentation sensible du point de fusion des acétates	50 gr/tonne	50 gr/tonne

8.2.2. Mise en évidence du "marquage" par l'analyse en chromatographie gazeuse des acétates sur colonnes normales.

	Sitostérol	Stigmastérol
a) Doses nécessaires à la mise en évidence de 2% de beurre tracé dans un beurre normal.	env. 250 gr/tonne, est fonction de la teneur du beurre en sitostérol (0,1%) et de la sensibilité des méthodes analytiques.	inférieure à 150 gr/tonne, est fonction uniquement de la sensibilité des méthodes analytiques.
b) Doses souhaitables pour l'efficacité du "marquage"	600 gr/tonne	200 à 250 gr/tonne

Du point de vue commercial, le prix du "marquage" du beurre par des quantités équivalentes de traceurs sera trois fois moins élevé dans le cas du "marquage" par le bêta sitostérol que dans le cas du "marquage" par le stigmastérol. Cependant, du fait que le stigmastérol ne semble pas être présent dans la graisse de beurre, alors que le bêta sitostérol peut y être mis en évidence à des doses pouvant atteindre 0,1% des stérøls totaux, la sensibilité de la mise en évidence en chromatographie gazeuse peut être considérablement accrue par l'utilisation de stigmastérol au lieu de bêta sitostérol.

Il faut considérer toutefois que l'obtention d'une telle sensibilité requiert l'emploi de détecteurs très sensibles et de colonnes à haut pouvoir de résolution; à ce niveau de sensibilité, les stérøls doivent être très purs et les risques de dégradation au sein de l'appareil réduits au minimum, ce qui n'est pas toujours facile à réaliser.

Une homogénéisation parfaite du stigmastérol dans les beurres tracés semble aussi plus difficile à atteindre que pour le bêta sitostérol, mais elle devrait pouvoir être réalisée facilement au niveau des entreprises chargées d'effectuer le "marquage".

Le stigmastérol est également plus facilement dégradable, sous des conditions thermiques très sévères, il est vrai, que le bêta sitostérol. D'autre part, le fait que son point de fusion est supérieur d'environ 21°C à celui du cholestérol (29°C si on considère les acétates), ne conduit à aucun avantage marqué sur le bêta sitostérol pour la mise en évidence de faibles quantités de beurres tracés dans un beurre normal par la lecture du point de fusion des acétates.

Nous considérons qu'en pratique, du point de vue analytique, la méthode de mise en évidence par la chromatographie gazeuse peut obtenir une efficacité deux ou trois fois supérieure avec une dose de 200 grammes de stigmastérol par tonne de graisse butyrique à celle qu'on obtiendrait avec une dose de 200 grammes de bêta sitostérol par tonne de graisse bu-

tyrique. Selon cette estimation, on pourrait pour le même prix commercial, "marquer" une tonne de "butter oil" avec une efficacité analytique analogue, soit par 250 grammes de stigmastérol commercial, soit par 600 grammes de bêta sitostérol commercial. Cependant, si on souhaite obtenir une méthode d'orientation ou de sélection des beurres susceptibles d'être fraudés par addition de beurres tracés, grâce à la mesure du point de fusion des acétates de stérols, il est évident que le choix du "marquage" par 600 grammes de sitostérol par tonne de "butter oil" s'impose au choix de 200 grammes de stigmastérol par tonne.

9. Conclusions

Le stigmastérol, comme le bêta sitostérol, serait un excellent traceur de la matière grasse butyrique. Son utilisation pour le "marquage" des beurres présenterait cependant, même à prix égal de la dénaturation, plus d'inconvénients que celle des sitostérols et ne devrait être envisagée qu'après l'utilisation de ceux-ci. L'utilisation du stigmastérol en vue du "marquage" de la graisse butyrique doit donc pouvoir être envisagée comme deuxième méthode de dénaturation utilisant un stérol comme traceur, si une distinction entre plusieurs espèces de beurres tracés s'avère nécessaire.

Une dose minimale de 150 à 200 grammes de sitgmastérol par tonne de graisse butyrique serait indispensable et une dose de 250 grammes par tonne serait hautement souhaitable pour obtenir un "marquage" efficace.

2 - 2 - VI Bibliographie

1. Schwartz D.P., Burgwald L.H., Shamey J., Brevington C.R.; J. Dairy Sci. 51: 929 - 1968
2. Brevington C.R., Caress E.A., Schwartz D.P.; J. Lipid Res. 11: 355 - 1970
3. Guyot A.; Bull. Rech. Agron. Gembloux 4: 484 - 507 - 1969
4. Guyot A.; Informations internes sur l'Agriculture - Commission des Communautés Européennes 74: 122 - Bruxelles Mai 1971
5. Poulos A.; Industrial and Engineering Chemistry 53: 949 - 1961
6. F I L 32: 1965 Norme internationale
7. F I L 38: 1966 Norme internationale
8. F I L 54: 1970 Norme internationale
9. Swern D.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products 3^d Ed. 18 - Deodorization 897: Interscience - New-York - 1964
10. Naudet M. et Cecchi G.; Rev. Fse Corps Gras 17: 529 - 1970.

VII. LES TOCOPHEROLS.

1. Les tocophérols des corps gras

Les tocophérols sont des composés à pouvoir vitaminique, liposolubles, présents en quantités extrêmement variables dans tous les corps gras naturels.

Généralement, les graisses animales n'en contiennent que des quantités très réduites tandis que certaines huiles végétales en sont largement pourvues. La vitamine E isolée par Evans (1) est, en fait, un mélange de tocophérols. Du point de vue de la structure chimique, les tocophérols sont un groupe de composés dérivés du 6 chromanol, dont la position 2 se trouve liée à un groupe méthyl et à une chaîne isoprénique comportant 16 atomes de carbone et dont les positions 5, 7 et 8 libres du noyau aromatique sont substituées par des groupes méthyl. Il existe deux séries de dérivés suivant que la chaîne latérale est soit saturée, soit insaturée, les méthyltolcols ou tocophérols, et les tocotriénols mis en évidence pour la première fois dans les huiles de son de riz et de palme (2).

Les tocophérols ou méthyltolcols sont les composés les plus connus. Les principaux tocophérols naturels sont:

le 5 - 7 - 8 triméthyltolcol	ou α tocophérol
le 5 - 8 diméthyltolcol	ou β tocophérol
le 7 - 8 diméthyltolcol	ou γ tocophérol
le 8 méthyltolcol	ou δ tocophérol

Les tocophérols ont des propriétés réductrices importantes qui en font des antioxygènes naturels des corps gras. Cependant, leur pouvoir antioxygène est médiocre par rapport à celui qu'on obtient avec les antioxygènes industriels de synthèse, et dans certains cas, les tocophérols en concentration élevée dans les huiles perdent entièrement leur caractère d'antioxygène et deviennent même prooxygènes (3).

Sur le plan industriel, les tocophérols totaux sont généralement dosés globalement. On utilise leurs propriétés réductrices vis à vis du fer ferrique qui est transformé en fer ferreux en solution alcoolique. Le fer ferreux forme un complexe avec la 2 - 2' bipyridine, dont on mesure l'absorption à 520 nm.

Les différents tocophérols réagissent différemment; aussi le dosage global exprimé d'habitude en α tocophérol, présente-t-il un côté conventionnel.

Les teneurs observées dans la littérature pour les tocophérols des corps gras alimentaires sont assez variables. Cette variabilité est sans doute un fait naturel, mais elle est aussi liée à la technique de détermination utilisée.

Les traitements industriels des corps gras, en particulier le raffinage et l'hydrogénation, ne devraient diminuer que légèrement (environ 10%) la teneur

en tocophérols totaux, mais en réalité, c'est rarement le cas.

Le tableau suivant illustre les teneurs moyennes en tocophérols totaux observées pour quelques corps gras d'origine végétale et animale.

Tableau I

Tocophérols totaux des huiles végétales et des graisses animales en mg/kg

<u>Huiles végétales</u>		<u>Graisses animales</u>	
Huile d'arachide	365 (4) (5)	Beurre (Canada)	10 à 50 (13)
Huile de coton	776 (4)(5)(6)	Beurre (Nouvelle Zélande)	24 à 39 (14)
Huile d'olive	51 (4)(7)	Beurre d'été	23 à 31 (15)
Huile de colza	576 (5)(6)		
Huile de maïs	782 (4)(8)(9)		17,2 à 38,4 (17)
Huile de coco	19 (4)	Beurre d'hiver	15 à 24 (15)
Huile de tournesol	546 (6)(7)(12)		
Huile de soja	960 (4)(6)(9)(11)(12)		8 à 21 (16)
Huile de germe de blé	2247 (4)(5)		6,8 à 19,1 (17)
Huile de sésame	426 (10)(11)	Saindoux	2,2 à 5 (19)
Huile de carthame	901 (4)(10)	Graisse de boeuf	10 (20)

En fait, les teneurs indiquées pour les huiles végétales sont des teneurs moyennes obtenues sur un nombre restreint d'échantillons. Ces teneurs sont susceptibles de varier fortement et sont toujours beaucoup plus considérables dans les huiles brutes. L'huile de soja brute contiendrait par exemple 2800 mg de tocophérols par kg (21) et l'huile de germe de blé brute environ 5200 mg par kg (22). L'huile d'olive vierge contiendrait environ 155 mg de tocophérols par kg. Après stockage la teneur descend à 41 mg/kg, tandis qu'elle est pratiquement nulle pour l'huile raffinée (10).

Les proportions des divers tocophérols sont extrêmement variables d'une huile végétale à l'autre avec une prédominance générale d' α et de γ tocophérol (23). L'huile d'olive ne contient que de l' α tocophérol.

La teneur en tocophérols totaux de la graisse du lait de vache et des beurres varie fortement suivant le régime alimentaire. Elle est nettement plus grande en été qu'en hiver (tableau I).

Selon Anglin et col. (13) 99,95% des beurres d'hiver ont une teneur en tocophérols inférieure à 35 mg/kg et 99,95% des beurres d'été, une teneur inférieure à 57 mg/kg. En fait, il est excessivement rare que la teneur en tocophérols totaux d'un beurre normal dépasse 50 mg/kg et nous n'avons jamais observé plus de 40 mg/kg pour les "butter oils".

La matière grasse du lait contient principalement de l' α tocophérol; la présence de γ tocophérol a cependant été confirmée. Selon Kanno (24), la teneur moyenne en α tocophérol observée sur la matière grasse de troupeaux individuels était de 33,8 mg/kg en été et 21,6 mg/kg en hiver et la teneur moyenne en γ tocophérol était de 1,8 mg/kg en été et 1,1 mg/kg en hiver. Il y aurait en moyenne 92,5% d' α tocophérol et 7,5% de γ tocophérol dans la graisse butyrique. Aucun autre tocophérol n'a pu y être mis en évidence.

2. Les tocophérols en tant que traceurs du beurre

Il résulte de l'étude sommaire ci-dessus que la teneur et la composition en tocophérols de la matière grasse du lait sont très différentes de celles des huiles végétales et peuvent donc être facilement distinguées de celles-ci. Ces différences ont été exploitées lors de la recherche de falsifications du beurre par addition de certaines huiles d'origine végétale (13)(25)(26)(27). Malheureusement, seules les huiles les plus riches en tocophérols, telle l'huile de soya, se prêtent très bien à la détermination de faibles taux de falsification par addition au beurre.

En vue d'un contrôle, il faut tenir compte des valeurs extrêmes du taux de tocophérols dans le beurre, valeurs extrêmes qu'on ne connaît que très approximativement, et il est nécessaire de disposer d'une méthode rapide, reproductible et suffisamment sensible de dosage du tocophérol total. Or, si les méthodes colorimétriques sont suffisamment sensibles, il faut bien souligner leur côté conventionnel, leur imprécision relative et leur manque de spécificité.

Par ailleurs, si les méthodes analytiques basées sur l'extraction de l'insaponifiable et la séparation des éléments de celui-ci par des techniques chromatographiques gagnent en spécificité, elles deviennent longues, onéreuses, difficilement accessibles en contrôle courant.

Pour obtenir un "marquage" convenable des beurres par les tocophérols, deux conditions essentielles devront être réalisées, d'une part l'obtention d'une méthode rapide et reproductible à défaut d'être suffisamment spécifique et précise de dosage du tocophérol total dans le beurre et, d'autre part, la disposition de concentrés de tocophérols commerciaux à haut degré de pureté.

2.1. Le problème biologique

Les tocophérols possèdent dans leur ensemble une action vitaminique E. Ils sont additionnés intentionnellement pour cet effet et comme antioxydant dans de nombreux corps gras alimentaires (margarines). Ce sont donc des composés indispensables dans l'alimentation humaine et leurs effets bio-

logiques sont bien connus. Il ne pourra y avoir aucun inconvénient biologique à augmenter artificiellement le taux de tocophérol total du beurre au niveau de celui qui est constaté dans les huiles brutes les plus riches, telles les huiles de soya ou les huiles de germes de céréales, par addition de concentrés de tocophérols naturels ou même par addition de tocophérols de synthèse.

2.2. Le problème économique

Le prix des concentrés de tocophérols (environ 50% de tocophérol total) serait actuellement (1972) de l'ordre de 26 U.C./kg. Cependant ce prix est susceptible de fluctuer suivant la demande.

Le prix du "marquage" est évidemment lié au pourcentage de tocophérol additionné comme traceur à la graisse butyrique.

Si, comme nous le verrons plus loin, une dose de 0,05% est un strict minimum admissible, cette dose correspondrait à 500 gr de tocophérol total réel à la tonne, soit 1 kg de produit commercial, ou 26 U.C. pour le "marquage" d'une tonne de beurre. Dans de telles conditions, le "marquage" du beurre avec un concentré de tocophérols serait évidemment une opération relativement coûteuse.

2.3. Le problème analytique

Les méthodes analytiques appliquées par l'industrie sont basées sur le caractère réducteur des tocophérols, et sur la formation d'un complexe entre le fer ferreux et la 2,2' bipyridine. Ces méthodes ont donc un caractère conventionnel, mais qui peut suffire pour un contrôle rapide. Les tocophérols sont dosés dans l'insaponifiable après séparation de celui-ci par des techniques appropriées, évitant spécialement les phénomènes d'oxydation, ou dans une solution huileuse elle-même. La séparation de l'insaponifiable est une technique longue, demandant beaucoup de soins pour éviter les pertes; elle est difficilement applicable à un contrôle rapide.

Le dosage direct du tocophérol dans le beurre par colorimétrie du complexe formé par le fer ferreux et la 2,2' bipyridine n'est pas spécifique. Cependant, divers auteurs ont préconisé un lavage acide qui n'affecte en rien la teneur en tocophérols totaux, mais élimine une grande partie des composés indésirables (25)(26)(27). Une correction doit être apportée pour le carotène qui n'est pas éliminé. Le traitement acide n'élimine pas non plus les antioxydants du type BHA ou BHT, mais ceux-ci ne sont normalement pas présents dans le beurre.

La méthode décrite par Mahon et Chapman (26) et reprise par Loury et col(25) ne donne donc pas une mesure du tocophérol réel, puisque d'autres composés de l'insaponifiable peuvent interférer.

Cependant elle est suffisamment sensible pour être utilisée comme technique de dépistage des fraudes. Comme ces auteurs, nous considérerons comme normale pour le beurre, une teneur en tocophérol "apparent" inférieure à 50 mg/kg et comme anormale une teneur supérieure ou égale à 60 mg/kg.

Pour les beurres stockés, il semble cependant que ces normes soient trop larges et on peut considérer comme suspect tout beurre dont la teneur en tocophérol total dépasse 40 mg/kg.

2.4. Dosage du tocophérol apparent dans le "butter oil"

Cette méthode est reprise de Loury et col (25), avec des modifications mineures.

On pèse 10 g de "butter oil" qu'on dissout dans l'éther de pétrole et on ajuste la solution à 50 ml dans une fiole jaugée. Cette solution est agitée dans une ampoule à décanter de 125 ml avec 10 ml d'acide sulfurique à 60%. On laisse reposer un quart d'heure et on décante la couche acide. On lave ensuite avec deux fois 25 ml d'eau. On opère en même temps avec un témoin de 50 ml d'éther de pétrole. On mesure l'absorption de la couche étherée à 440 n m en prenant le témoin comme référence, soit D 440. On prélève 10 ml de la solution étherée, ajoute dans l'ordre 3,5 cc de bipyridine 2 2' à 0,07% dans l'alcool absolu, 0,5 cc de chlorure ferrique à 0,5% dans l'alcool absolu, 4 cc d'alcool absolu et 2 cc d'eau bidistillée. On agite 10 secondes et laisse séparer la couche hydroalcoolique (10 ml) qui contient le complexe coloré. On enlève la couche étherée avec une seringue et on mesure l'extinction de la solution alcoolique à 520 n m endéans 5 à 10 minutes, soit D 520. D 520 - D 540 correspond sensiblement à la mesure de l'extinction du complexe formé à partir des tocophérols de la prise d'essai (2 gr) dans 10 ml de solution. L'extinction spécifique du complexe coloré à 520 n m étant de 392 pour 1% tocophérol ($E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 392$) on calcule le tocophérol apparent total selon la formule:

$$\text{Tocoph. total en mg/kg} = \frac{(D 520 - D 540) \times 10^4}{39,2 \times 2}$$

N.B. L'alcool éthylique doit être exempt d'aldéhydes (préparé par addition de 1 g de permanganate de potassium et de 2 g de potasse en pastilles à 1 l. d'alcool absolu et redistillation).

L'éther diéthylique doit être exempt de peroxydes (préparé par agitation de 500 ml d'oxyde diéthylique avec une solution de 4 g de nitrate d'argent dans 30 ml d'eau et 2 g de potasse dans 50 ml d'eau) (28)

Une analyse systématique de beurres stockés n'a pas été entreprise. Parmi les "butter oils" le taux de tocophérol apparent total était de l'ordre de 15 à 25 mg/kg.

3. Les concentrés commerciaux de tocophérols

Les concentrés de tocophérols sont préparés pour le commerce par distillation moléculaire des huiles végétales, de leurs boues ou distillats à la vapeur. Des concentrés de tocophérols commerciaux nous ont été fournis par une firme européenne.

La teneur en tocophérol total obtenu après solubilisation du produit dans l'alcool absolu par formation du complexe coloré à la bipyridine 2 2' et colorimétrie a été estimée à 55%, alors que la firme garantissait 50%.

Les tocophérols totaux ont été séparés par chromatographie gazeuse (Fig.1) sur colonne apolaire dans les conditions suivantes:

Colonne: Acier inox - longueur 2 m - diam. 3 mm
Phase: 5% S E 52 sur Aeropak 30, 100 - 120 mesh
Température 240°C.
Gaz porteur: Azote 35 ml/min.
Détecteur: F I D 260°C.
Injecteur: 290°C.
Quantité injectée: 0,1 ug

Dans ces conditions les temps de rétention relativement à celui de l' α tocophérol sont de l'ordre de 0,80 pour les β et δ tocophérols (non séparés) et de 0,60 pour le γ tocophérol (Fig. 1).

La composition estimée par chromatographie gazeuse était de

10,1% de γ tocophérol
37,4% de $\beta + \delta$ tocophérol
52,5% d' α tocophérol

Par chromatographie sur couche mince de silice avec le chloroforme comme éluant on peut également séparer les α , $\beta + \delta$ et γ tocophérols.

Une confirmation de la composition globale a été obtenue en grattant les spots contenant les différents tocophérols, en éluant ceux-ci par l'alcool et en effectuant un dosage par colorimétrie à la bipyridine 2 2'.

Fig. 1 Chromatographie gazeuse des tocophérols d'un concentré commercial

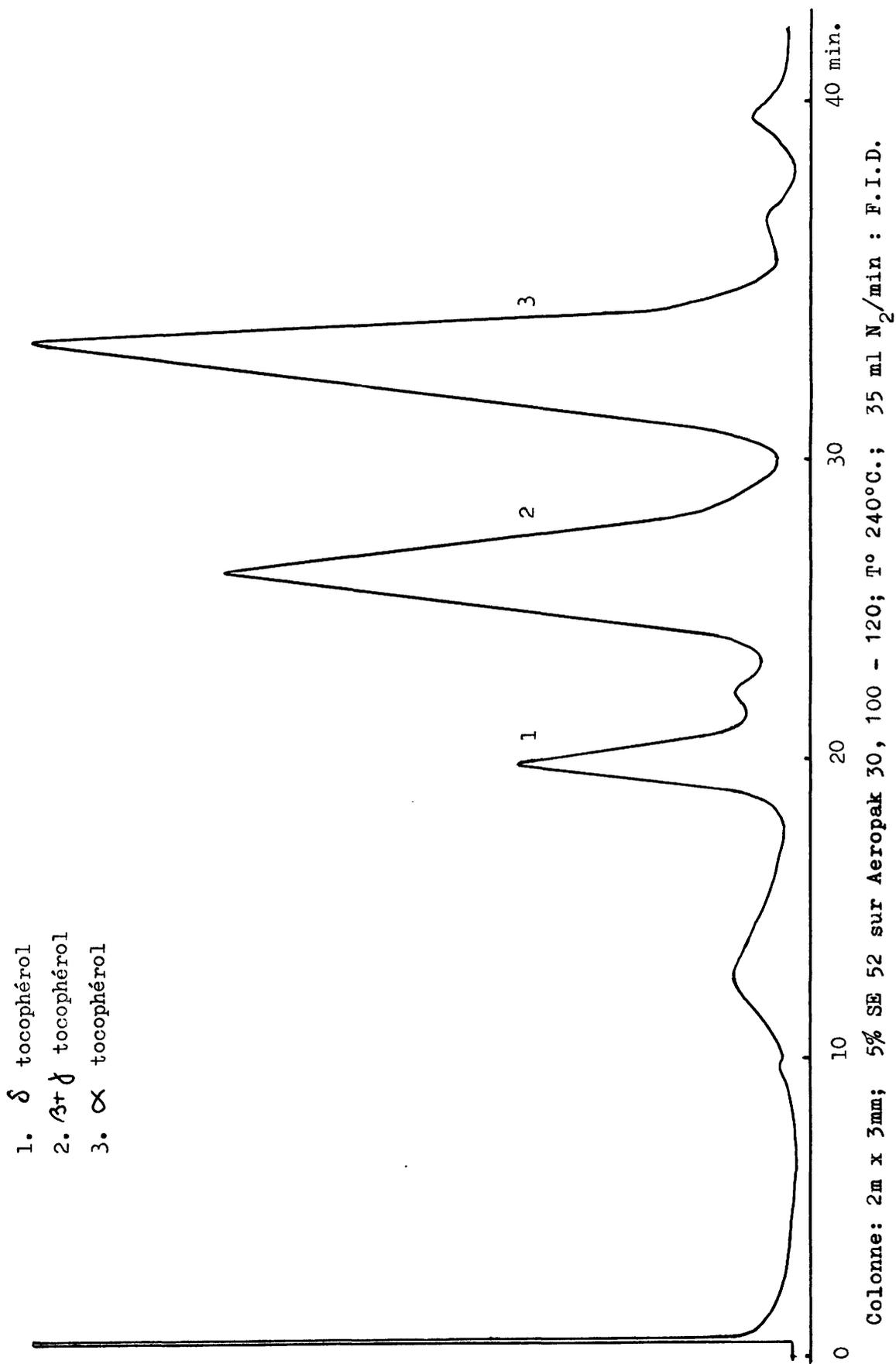
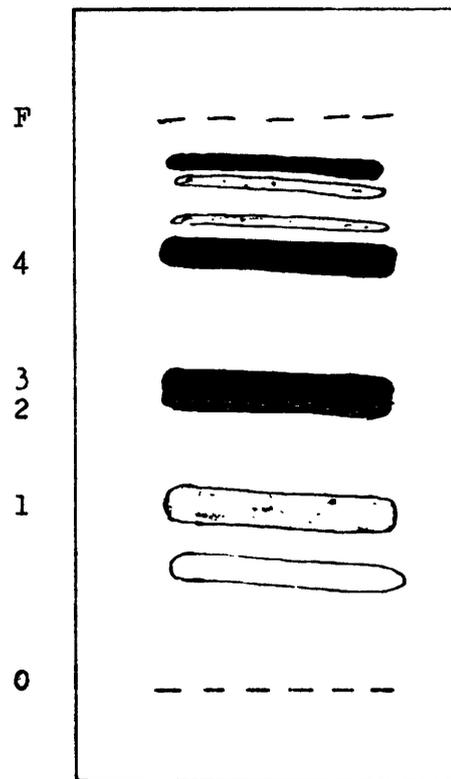


Fig. 2 C.c.m. de gel de silice des tocophérols

Développement: Chloroforme

Révélateur: 20% de pentachlorure d'antimoine dans le
tétrachlorure de carbone



Concentré de tocophérols: 5 microl.

- 0 origine
- 1 δ tocophérol
- 2 β tocophérol
- 3 γ tocophérol
- 4 α tocophérol
- F front

Si on ne procède pas à une analyse quantitative, les tocophérols sont révélés par le pentachlorure d'antimoine à 20% dans le tétrachlorure de carbone, le réactif d'Emmerie Engel, l'acide phosphomolybdique à 20% dans l'éthanol ou un autre réactif non spécifique.

La révélation par le pentachlorure d'antimoine a permis d'établir la présence simultanée des β (color. brune) et γ (color. verte) tocophérols dans l'échantillon analysé.

Les R f des différents tocophérols sont approximativement 0,75 (α toc.) 0,50 (β toc.) 0,54 (γ toc.) et 0,35 (δ toc.) (Fig. 2).

Les concentrés commerciaux étaient d'autre part très riches en phytostérols (ca 7%), le support étant une huile végétale.

La composition des acides gras de la fraction huileuse révèle une haute proportion d'acide oléique (35%) et d'acide linoléique (35%), des teneurs moins élevées en acide palmitique (12%) et stéarique (8%) et également, la présence d'acides inférieurs vraisemblablement issus de l'huile de coco (3,5% C12). L'analyse des stérols indique une teneur élevée en sitostérols (60%) et campesterol (30%) et moins élevée en stigmastérol (inférieure à 8%). En fait, il semble que le support huileux ne soit pas une huile pure et il est certain que les procédés industriels d'extraction ont pu modifier la composition des acides gras et des stérols de cette huile.

4. Choix du taux de traceur

Un choix rationnel du taux de traceur à additionner au beurre en vue de son "marquage" doit tenir compte de la présence naturelle de tocophérols dans la matière grasse butyrique. Or, si normalement en été, cette teneur peut atteindre parfois environ 50 mg/kg, elle sera toujours beaucoup moins élevée dans les "butter oils" issus de beurres stockés où pratiquement elle dépasse rarement 25 mg/kg et peut descendre à 10 mg/kg.

Si un beurre "marqué" doit contenir au moins 60 mg de tocophérols par kg, il faut au minimum lui apporter 50 mg supplémentaires par kg ou 50 mg/tonne. Pour qu'un mélange à 5% de beurre "marqué" dans un beurre normal possède une teneur minimum de 60 mg/kg de tocophérols, il sera nécessaire d'ajouter 1 kg de tocophérols purs par tonne de "butter oil" à dénaturer, soit encore près de 2 kg de concentré de tocophérols commerciaux.

Au prix de revient de plus de 50 U.C. par tonne, le "marquage" du beurre devient certainement trop coûteux. D'autre part, on ne connaît pas encore l'effet que pourrait avoir l'addition de quantités si élevées sur la stabilité de la matière grasse du beurre, les concentrations élevées de tocophérols pouvant avoir un effet prooxygène (3).

Pour ces raisons, nous avons limité nos essais au "marquage" par 1 kg de tocophérols commerciaux à la tonne, soit 550 gr de tocophérols purs/tonne. Le choix d'une telle dose permettra la mise en évidence dans tous les cas de 10% de beurre marqué, dans un beurre normal.

5. Dosage du tocophérol apparent dans les beurres tracés

La méthode de base est celle décrite ci-dessus au chapitre 2.4. Cependant, afin de rester dans la partie linéaire de la courbe de la loi de Lambert - Beer, les prises d'essais doivent être choisies approximativement proportionnellement aux concentrations de tocophérols, pour rester dans le domaine des extinctions comprises entre 0,3 et 0,9.

soit 2 cc (0,4 g) pour le beurre tracé par 1 kg de tocophérols commerciaux à la tonne.

4 cc pour un mélange à 50% de beurre tracé dans un beurre normal

8 cc pour un mélange à 25%

10 cc pour les dilutions plus faibles.

Il n'a pas été appliqué de correction pour le carotène, lorsque la prise d'essai était inférieure à 10 cc; dans ce cas, l'erreur par excès commise est relativement faible puisque la concentration en tocophérols est élevée (supérieure à 140 mg/kg) et n'affecte aucunement le classement entre beurres normaux, beurres suspects et beurres additionnés de beurres tracés.

En pratique, seront considérées comme suspectes, les valeurs d'extinction obtenues dans les conditions ci-dessus, qui seront comprises entre 0,35 (44 mg/kg) et 0,45 (58 mg/kg) et anormales les valeurs supérieures à 0,45.

Les échantillons suspects peuvent éventuellement faire l'objet d'une analyse chromatographique sur couche mince des tocophérols après leur séparation de l'insaponifiable.

La mise en évidence de β ou γ tocophérols dans un beurre en proportion supérieure à 20% de l' α tocophérol est une anomalie qui se constatera plus aisément que la présence de δ tocophérol.

Cependant, du fait de la richesse des concentrés de tocophérols commerciaux en phytostérols, il est encore plus simple d'effectuer une analyse des stérols, de mettre en évidence le stigmastérol, ou d'observer un rapport $\frac{\text{sitostérol} \times 100}{\text{cholestérol}}$ supérieur à 0,2.

Le dosage global des tocophérols suivant la méthode proposée n'est évidemment pas spécifique. Les antioxygènes, tels le BHA et le BHT resteraient dans la graisse après lavage acide et interféreraient sur le dosage en augmentant la formation de complexe coloré. Cependant, ces produits ne peuvent se trouver

dans les beurres et leur mise en évidence par des méthodes simples est assez facile.

6. Elimination du traceur de la graisse butyrique

6.1. L'autoxydation

Les tocophérols, étant des antioxygènes, sont des composés très sensibles à l'oxydation et leur teneur est susceptible de diminuer graduellement pendant le stockage.

Les courbes de variations de la teneur en antioxygènes dans les lipides en cours d'oxydation ont en général une allure très rapidement décroissante (29). Nous avons d'ailleurs constaté que les beurres de frigo en bon état de conservation ont une teneur relativement basse en tocophérols totaux (20 à 30 mg/kg) alors que ce sont généralement des beurres d'été.

Des essais d'orientation ont alors été entrepris pour observer la diminution relative du taux de tocophérol au cours du temps.

Des échantillons de 500 gr contenant 1028 et 220 gr de tocophérols totaux par kg de "butter oil" ont été placés pour une partie à la température du frigidaire (env. 5°C.) et pour une autre partie à l'étuve à 70°C.

Le taux de tocophérol total du "butter oil" conservé à 5°C n'a pas diminué de manière significative après six semaines (moins de 5%).

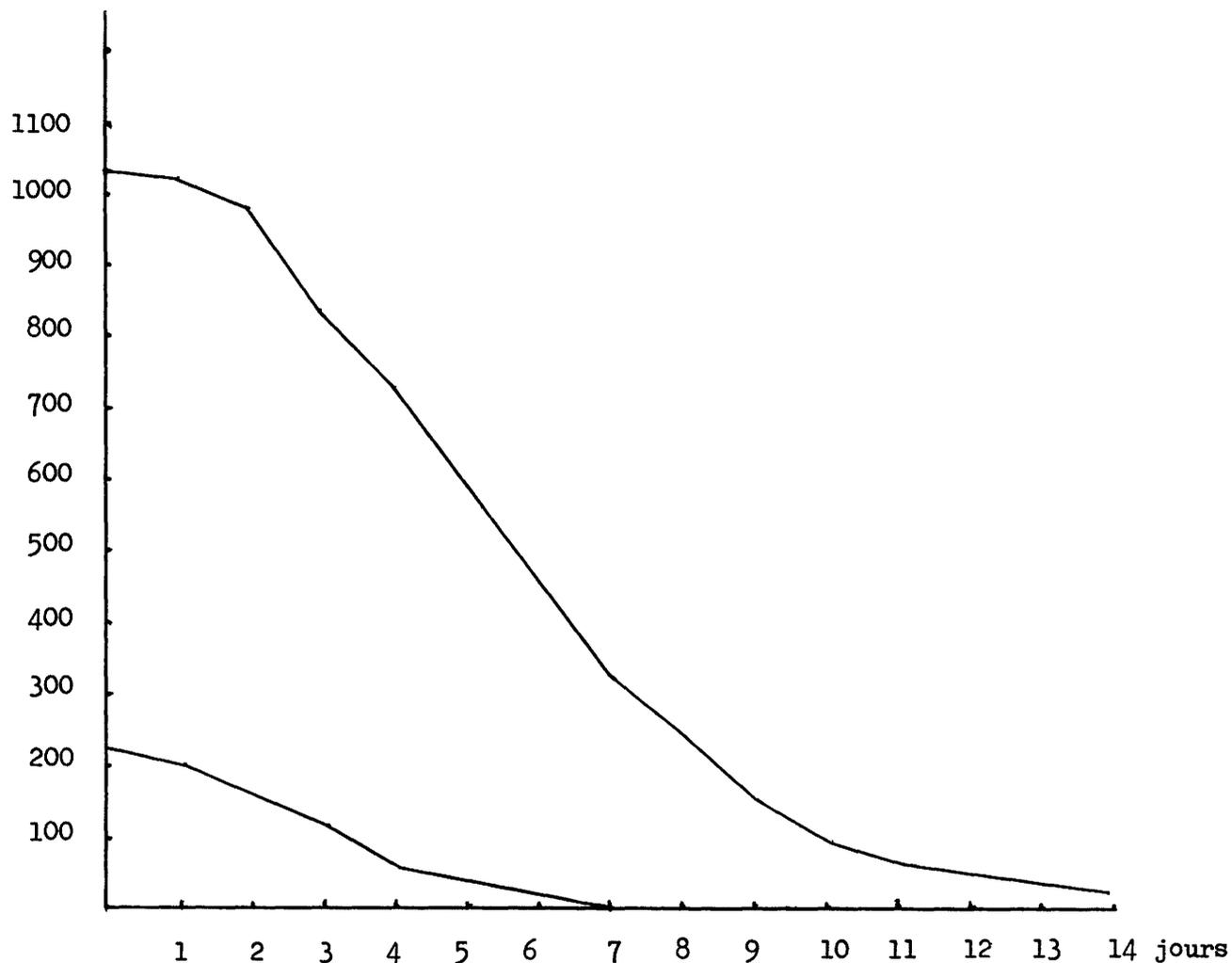
Pour les échantillons placés à l'étuve à 70°C, la diminution a été relativement réduite les deux premiers jours et s'est accentuée le troisième jour. Il a fallu attendre 12 jours pour voir le taux de tocophérols tomber en-dessous de 60 mg/kg pour l'échantillon contenant au départ 1028 gr de tocophérols totaux par tonne de "butter oil" et 4 jours pour l'échantillon contenant au départ 220 gr de tocophérols totaux par tonne.

Aucun essai n'a été effectué à température ordinaire (ca 20°C). Cependant, par analogie avec les résultats observés dans la littérature (30) (31) pour des huiles végétales, on peut penser que la teneur en tocophérols des "butter oils" "marqués" ne diminue que très lentement au cours d'une période de 1 mois à 2 mois à 20°C.

En fait, la teneur en tocophérols totaux des corps gras est en diminution continuelle pendant leur stockage, selon l'intensité des phénomènes d'autoxydation, mais dans les conditions ordinaires de conservation des "butter oils" à des températures inférieures à 0°C, il n'y a pas lieu de craindre des modifications notables de la teneur en tocophérols pendant plusieurs mois, délai amplement suffisant pour un contrôle efficace de produits généralement destinés à être consommés rapidement.

Tableau II: Evolution de la teneur en tocophérol total à 70°C dans des beurres "marqués".

Toc. total
mg/kg



Si d'autre part, une température élevée et l'autoxydation accélérée qui en résulte tendent à faire baisser beaucoup plus rapidement la teneur en tocophérols, ce n'est pas sans altérations de la matière grasse, auxquelles il sera difficile et coûteux de remédier.

6.2. Le raffinage

Les tocophérols sont des substances huileuses liposolubles. La solubilisation dans les matières grasses se fait aisément. On ne peut les extraire à l'eau ni diminuer leur teneur d'une manière conséquente par entraî-

nement à la vapeur. Lors du raffinage des corps gras, la démucilagination peut en entraîner une partie avec les phosphatides, mais celle-ci n'a jamais lieu d'être effectuée sur le "butter oil", celui-ci ne contenant d'ailleurs pratiquement plus de phosphatides.

Les procédés de désodorisation à la vapeur sous vide sont également susceptibles d'enlever une petite partie des tocophérols des corps gras. De manière générale cependant, la préparation industrielle des huiles alimentaires provoque peu de pertes, 6% au maximum au cours du raffinage alcalin et moins encore par désodorisation à la vapeur. L'hydrogénation ne produirait aucune perte sensible (31)(32).

7. Substitution des tocophérols par d'autres substances à caractère antioxygène

Les méthodes de détermination des tocophérols totaux dans les corps gras basées sur la colorimétrie du complexe à la bipyridine 2 2', ne sont valables que pour autant que l'on ait éliminé des corps gras, les substances à caractère oxydant ou réducteur ou celles dont l'absorption à 520 n m pourrait interférer lors de la lecture au spectrophotomètre. Cette élimination est le point délicat de la méthode utilisée. Ainsi, les tocophérols pourraient-ils être substitués par des antioxygènes, tels le BHA, le BHT ou même le sésamol et donner également des réactions bien nettes. Cependant l'addition de ces substances est généralement interdite dans les beurres et leur présence éventuelle pourrait être recherchée par des tests spécifiques.

8. Conclusions

Du fait des variations naturelles de la teneur en tocophérols des "butter oils" au cours du temps et selon le traitement industriel subi, à cause de la présence d'un taux limité mais réel de tocophérols dans la graisse butyrique, à cause de la non spécificité d'une méthode rapide de dosage et de son caractère conventionnel qui lui confère une précision relative, l'addition de tocophérols aux beurres ne donne pas lieu à l'obtention d'une méthode analytique simple, très sensible et très précise, applicable au contrôle des beurres "marqués". Par contre un test simple et efficace a pu être élaboré. Ce test, basé sur les propriétés réductrices du tocophérol et la réaction d'Emmerie Engel, est non spécifique, mais il met en évidence une anomalie dans la composition de la matière grasse, ce qui est l'essentiel; pour s'assurer de la nature de l'anomalie, des analyses plus poussées (c. c. m. de l'insaponifiable) devront être effectuées.

Pour pouvoir déterminer analytiquement par ce test 5% de beurre "marqué" dans un beurre normal, il serait nécessaire d'ajouter dans le beurre à tracer 1 kg de tocophérols purs à la tonne, soit 1,9 kg de concentrés commerciaux à 55%. Le prix du "marquage" deviendrait sans doute prohibitif puisque dans les conditions actuelles (1972), il se monterait à 50 U.C. par tonne de "butter oil". Si on réduit le taux de tocophérols à ajouter pour "marquer" le beurre, la sensibilité analytique du test est évidemment réduite d'autant.

Notons aussi que l'incidence de hautes teneurs en tocophérols sur la conservabilité du "butter oil" "marqué" devrait être étudiée, un caractère pro-oxygène n'étant pas à exclure.

Si les conditions économiques le permettaient, le "butter oil" pourrait être "marqué" plus simplement encore par du tocophérol de synthèse (α tocophérol). Cependant, à l'avantage des concentrés naturels, signalons outre les facteurs économiques, la composition en α , β , δ et γ tocophérols, différant très largement de celle de la matière grasse butyrique et la présence d'un taux important de phytostérols, facilement mis en évidence parmi les stérols des corps gras animaux. Cet avantage, du point de vue analytique, risque pourtant de devenir un inconvénient sur le plan de l'efficacité du "marquage". La présence dans un beurre tracé de concentrés commerciaux de tocophérols contenant des phytostérols, pourrait y masquer dans une certaine mesure l'addition dans un but de falsification, de faibles quantités de matières grasses végétales. En résumé, si l'élimination du tocophérol ou du moins une diminution suffisante de son taux dans le "butter oil" sans altération importante de la matière grasse butyrique est économiquement difficilement imaginable, ce sont des facteurs analytiques et davantage économiques qui rendent actuellement problématique l'utilisation des concentrés de tocophérols naturels comme traceurs des beurres.

Les inconvénients analytiques peuvent être facilement surmontés si on s'en tient à un test. L'emploi de la bathophénantroline comme composé chromogénique au lieu de la bipyridine 2 2' multiplie par 2,5 la sensibilité de la méthode colorimétrique (33). L'utilisation de l' $\alpha\alpha$ diphényl β picrylhydrazyl (D.D.P.H.) offre également des perspectives tout aussi intéressantes (34). Actuellement, la méthode la plus sensible, mais qui demande un soin particulier, reste la chromatographie gazeuse. Des méthodes officielles basées sur la chromatographie gazeuse ont d'ailleurs été très vite acceptées pour le contrôle des produits pharmaceutiques (35) (36).

Quant aux inconvénients de nature économique, il n'est pas exclu de les voir s'amenuiser peu à peu, si l'amélioration des techniques industrielles d'extraction ou de synthèse contribue à faire baisser suffisamment les prix commerciaux des tocophérols naturels ou de synthèse.

2 - 2 - VII Bibliographie

1. Evans H.M., Emerson O.H., Emerson G.A.; J. Biol. Chem. 113: 319 - 1936
2. Pennock J.F., Hemming F.W., Kerr J.D.; Biochem. Biophys. Res. Com. 17: 542 - 1964
3. Loury M., Bloch C. et François R.; Rev. Fr. Corps gras 13: 747 - 1966
4. Slover H.T., Lehman J. and Valis R.J.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 46: 417 - 1969
5. Kovats L.T. and Berndorfer - Krazner E.; Nahrung 11: 671 - 1967
6. Sturm P.A., Parkhurst R.M. and Skinner W.A.; Anal. Chem. 38: 1244 - 1966
7. Niederstebruch A. und Hinsch I.; Fette, Seifen, Anstrichm. 69: 559 - 1967
8. Schmidt H.E.; Fette, Seifen, Anstrichm. 70: 63 - 1968
9. Green J., Marcinkiewiez S. and Watt P.R.; J. Sci. Food Agr. 6: 274 - 1955
10. Gracian J. and Arevalo G.; Grasas Aceites :6: 278 - 1965
11. Herting D.C. and Drury E.E.; J. Agr. Food Chem. 17: 785 - 1969
12. Jaky M.; Fette, Seifen, Anstrichm. 69: 507 - 1967
13. Anglin C., Mahon J.H. and Chapman R.A.; J. Dairy Sci. 38: 333 - 1965
14. Mc Gillivray W.A.; New Zealand J. Sci. Technol. 38 A: 466 - 1956
15. Thompson S.V., Henry K.M. and Kon S.K.; J. Dairy Res. 31: 1 - 1964
16. Kruisheer C.I.; XIV th Int. Dairy Congr. 2 (Part 1): 202 - 1956
17. Antila V., Nordland J. and Antila M.; Chem. Abstr. 62: 13764 g - 1965
18. Quaife M.C.; J. Biol. Chem. 169: 513 - 1947
19. Ripert J. et Sisley J.P.; Ind. Corps Gras 2: 106 - 1946
20. Kofler M.; Helv. Chim. Acta 26: 2166 - 1943
21. Rawlings H.W. and al.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 25: 24 - 1948
22. Karrer P. et Keller H.; Helv. Chim. Acta 23: 464 - 1940
23. Slover H.T.; Lipids 6: 291 - 1970
24. Kanno C., Yamauchi K. and Tsugo T.; J. Dairy Sci. 51: 1713 - 1968
25. Loury M. et Bloch C.; Rev. Fr. Corps Gras 11: 591 - 1964
26. Mahon J.H. and Chapman R.A.; Anal. Chem. 26: 1195 - 1954
27. Bird E.W., Patel D.J. and Handwerk R.L.; J. Dairy Sci. 34: 484 - 1951
28. Wolff J.P.; Manuel d'analyse des corps gras - Azoulay Ed. Paris - 181 - 1968
29. Holman R.T.; Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids - Pergamon Press, London 2: 51 - 1954
30. Dubois P.; An. Technol. agric. 13: 97 - 1964
31. Dubois P.; An. Technol. agric. 13: 105 - 1964
32. Swift C.E., Mann G.E. and Fisher G.S.; Oil and Soap 21: 317 - 1944
33. Tsen C.C.; Anal. Chem. 33: 849 - 1961
34. Glavind J. and Holmer G.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 44: 539 - 1967
35. Bowman P.B. and West W.E.; J. Pharm. Sci. 57: 470 - 1968
36. Official Methods of the A.O.A.C. n° 39.063 - 779.11 Ed. 1970

2.3. Les additifs des corps gras

Les additifs des corps gras qui pourraient être éventuellement utilisés comme traceurs doivent présenter en premier lieu toutes les garanties d'innocuité biologique.

Pour cette raison, nous n'examinerons que les additifs autorisés par les diverses législations européennes, en ne dépassant pas les doses maximales prévues.

Parmi les additifs pour corps gras alimentaires prévus par les diverses législations européennes, nous distinguerons les matières colorantes, les antioxygènes et leurs synergistes, les agents émulsifiants.

Nous ne considérerons pas les antimoussants (diméthylpolysiloxane) autorisés à des doses de l'ordre de quelques p.p.m. pour la friture, ni les arômes qui peuvent être extraits par désodorisation (vanilline).

2.3.1. Les matières colorantes

Ce sont des produits naturels ou des extraits de produits naturels.

On peut obtenir le β carotène et certains caroténoïdes par synthèse.

L'addition de rocou ou de β carotène au beurre d'hiver est très souvent effectuée afin d'obtenir une coloration conforme au goût du public.

Le β carotène est un colorant naturel de la matière grasse du lait de vache. La teneur en carotène de la matière grasse du lait est extrêmement variable suivant les saisons et suivant les régions, soit de 4 à 12 mgr par kg selon les observations de Kuzdzal-Savoie (1). La teneur en carotène des beurres subit les mêmes variations saisonnières et régionales que celles des laits. Hugo et Causeret (2) signalent une teneur moyenne de 242 $\mu\text{g}/100$ gr pour les beurres alsaciens et 455 $\mu\text{g}/100$ gr pour les beurres normands. Pour des beurres canadiens, Searles et Armstrong (3) donnent une moyenne de 915 $\mu\text{g}/100$ gr en été, 307 $\mu\text{g}/100$ gr en hiver et 616 $\mu\text{g}/100$ gr pour l'ensemble de l'année. Casalis et al (4) observent un éventail de teneurs en β carotène des beurres français allant de traces à 1000 et même 1200 $\mu\text{g}/100$ gr avec une teneur moyenne pondérée de 300 à 400 $\mu\text{g}/100$ gr.

En réalité, la teneur en β carotène d'un beurre est non seulement fonction de l'origine de la matière grasse, mais elle diminue également au cours du stockage. A basse température, cette diminution est cependant très faible. Ainsi, suivant Casalis et al (5), la diminution de la teneur en β carotène de plaquettes de beurre de 250 gr, emballées dans du papier aluminium, est à peine perceptible après quatre mois de conservation à 4°C.

Sans doute des pertes plus importantes ont-elles lieu au cours de la fabrication, du transport ou des manipulations ultérieures de la matière grasse butyrique, car certains beurres commerciaux ont une teneur en β carotène presque nulle.

Le β carotène et les caroténoïdes en général sont très sensibles à l'oxydation et aux températures élevées. Ils sont en grande partie détruits lors de la désodorisation à la vapeur sous vide poussé ou par hydrogénation (6).

On peut les enlever des corps gras en filtrant ceux-ci sur terres décolorantes ou sur noir animal.

Le β carotène étant présent naturellement dans la graisse de beurre et son addition étant permise, il était pratiquement impossible de l'utiliser comme traceur. Par contre, on s'est servi d'un de ses dérivés par dégradation oxydative, l'ester éthylique de l'acide β apo 8' caroténoïque qui n'est pas naturellement présent dans les beurres.

Ce composé fut préconisé comme traceur au sein de la C.E.E. (règlement 411/70 du 4 mars 1970) à la dose de 15 gr/tonne. Comme traceur visuel, son effet était insuffisamment marqué, mais on pouvait établir rapidement sa présence par chromatographie sur colonne d'alumine. Cependant, comme le β carotène, l'ester éthylique de l'acide β apo 8' caroténoïque est peu stable. Il se dégrade à la chaleur et est facilement oxydé. Il est détruit au cours de la désodorisation à la vapeur sous vide et par une légère hydrogénation. La filtration de la graisse "marquée" sur terres décolorantes suffit à l'éliminer.

D'autres matières colorantes, telles les chlorophylles, furent aussi utilisées de temps à autre pour "marquer" la graisse de beurre (règlement C.E.E. 1732/69 du 1/9/69). Ces composés, en raison de leur nature peu stable, de leur prix de revient et de leur adsorption facile sur terres décolorantes ont été rapidement écartés comme traceurs des "butter oils".

En réalité, les pigments naturels liposolubles présentent tous les mêmes inconvénients comme traceurs des corps gras. En général, ils sont peu stables, sensibles à la chaleur, à l'oxydation et à l'hydrogénation et, surtout, ils sont éliminables par des techniques actuellement bien connues. Il est probablement illusoire de rechercher un traceur efficace de la graisse de beurre qui, en particulier, ne pourra être éliminé de celle-ci économiquement, parmi les colorants liposolubles actuellement autorisés par les législations des différents pays européens.

2.3.2. Les antioxygènes

Les antioxygènes ont pour effet de protéger les corps gras contre l'autoxydation. Il existe des antioxygènes naturels et des antioxygènes obtenus par synthèse. Parmi les antioxygènes naturels, citons les tocophérols, présents dans tous les corps gras mais principalement dans certaines huiles végétales, le sésamol de l'huile de sésame, le gossypol de l'huile de coton et l'acide nordihydroguaiarétique extrait de la créosote.

L'étude des tocophérols comme traceurs éventuels du beurre a été envisagée au chapitre 2.2.VII.

Le sésamol fut un traceur dont l'utilisation a été très grande pour "marquer" le beurre, en dépit de son élimination relativement facile des corps gras par des procédés de raffinage ou de désodorisation. Son étude en tant que tel, a été décrite dans la première partie de ce travail, récemment publiée par la C.E.E. (7).

Le gossypol présente des inconvénients de nature biologique et est d'ailleurs éliminé de l'huile et des tourteaux de coton.

L'acide nordihydroguaiarétique (N.D.G.A.) est relativement peu soluble dans les graisses et peut être éliminé au moyen de lavages par des solutions aqueuses légèrement alcalinisées.

Parmi les antioxygènes de synthèse, citons principalement le butylhydroxyanisol (B.H.A.), le butylhydroxytoluène (B.H.T.) et les gallates (propyl, octyl, dodécyl).

L'addition de ces divers antioxygènes synthétiques est autorisée par pratiquement toutes les législations européennes à une dose limitée le plus souvent à 0,01%.

Il existe actuellement des tests qualitatifs parfaitement mis au point pour la détermination de telles doses dans les corps gras. Citons particulièrement les méthodes préconisées par l'A.O.A.C. (8) et celles décrites dans les ouvrages spécialisés (9) (10)

Les gallates sont peut être les composés les plus facilement mis en évidence par ces méthodes. Ils sont plus solubles dans les graisses que le N.D.G.A. mais ils sont relativement solubles dans l'eau, principalement les gallates inférieurs, et peuvent être facilement extraits des corps gras par lavages répétés à l'eau, surtout en milieu alcalin. Ils ne peuvent donc constituer des traceurs pour les "butter oils".

Le B.H.A., mélange des deux isomères 2 et 3 tert. butyl 4 hydroxyanisol est insoluble dans l'eau et présente moins d'inconvénients que les gallates, particulièrement en biscuiterie. C'est probablement l'antioxygène le plus

utilisé industriellement. Il est très facilement mis en évidence à la dose de 0,01% par la méthode A.O.A.C. ou par colorimétrie du composé bleu formé en milieu alcalin avec la 2 - 6 dichlorobenzoquinone 4 chlorimide (11) (12). Des méthodes d'analyse quantitative ayant recours à la chromatographie sur couche mince ont été mises au point (13) (14), et certaines utilisent également la fluorimétrie, après isolement par chromatographie sur plaque (15). L'analyse quantitative des antioxygènes après séparation par chromatographie sur couche mince est peu indiquée pour le contrôle courant, car la précision des résultats obtenus dépendra de l'extraction plus ou moins complète, de la séparation et de la récupération quantitative sur plaque de ces produits. Une revue des méthodes de séparation et de dosage des antioxygènes dans les produits alimentaires a été donnée par Stuckey et Osborne en 1965 (16).

De toute manière, le B.H.A. est assez volatil et peut être extrait des corps gras à la vapeur sous vide.

Le B.H.T. ou butylhydroxytoluène est souvent utilisé dans l'industrie en combinaison avec le B.H.A., ces deux antioxygènes possédant une action synergique réciproque. Le B.H.T. est insoluble dans l'eau comme le B.H.A., mais il est encore beaucoup plus volatil que celui-ci et il peut être entraîné facilement à la vapeur, dans des conditions tout à fait ordinaires. La détermination qualitative et quantitative du B.H.T. est plus délicate que celle du B.H.A. et la sensibilité des tests colorimétriques est également moins bonne pour le premier antioxygène que pour le second.

En réalité, tous les antioxygènes synthétiques utilisés actuellement sont assez instables à la chaleur et résistent mal à la cuisson. Le B.H.A. et le B.H.T. sont normalement éliminés des corps gras dans des conditions normales de désodorisation.

Le B.H.A.

1. Le B.H.A., traceur économique à dépistage rapide

Comme il est décrit ci-dessus, le B.H.A. ne pourra constituer un excellent traceur des "butter oils" à cause de sa dégradation oxydative et surtout à cause de sa volatilité relative rendant son élimination possible par des procédés de désodorisation à la vapeur sous vide. Cependant, de tels procédés, s'ils sont courants dans l'industrie des corps gras, sont moins répandus dans l'industrie laitière. En conséquence, au sein de celle-ci, les possibilités d'extraire le B.H.A. peuvent être restreintes et contrôlables. D'autre part, le B.H.A. peut être obtenu dans le commerce à un prix moyen de 15 U.C./kg. Il a été proposé jadis comme traceur des graisses de substitution des beurres à la dose de 0,02%, en raison de la simplicité de son dépistage (25).

Etant donné que la dose admissible dans les corps gras, est actuellement de 0,01%, le prix de revient du "marquage" serait dérisoire.

Additionné au "butter oil" au taux de 0,01%, le BHA pourrait ainsi, s'il est facilement décelable par des tests, constituer un traceur d'appoint à détection rapide, à côté d'un traceur non éliminable dont la détermination serait plus longue.

Des tests qualitatifs ont été effectués avec le réactif de Gibs (2 - 6 dichlorobenzoquinone 4 chlorimide) selon la méthode de Mahon et Chapman, pour connaître la limite de sensibilité de cette méthode appliquée aux "butter oils" additionnés de BHA. D'autres tests ont été effectués après chromatographie de l'extrait alcoolique de BHA sur plaque de gel de silice, en utilisant le réactif d'Emmérie Engel ou le réactif de Gibs comme révélateur et enfin, des méthodes de chromatographie gazeuse ont été expérimentées.

2. Mise en évidence du BHA dans les beurres "marqués"

A) Tests colorimétriques

Le taux de traceur à ajouter au "butter oil" à "marquer" a été fixé à 0,01%, qui est la limite admise dans les suifs et les saindoux.

On a réalisé des dilutions de 2,5 - 5 - 10 - 20 - 50% de "butter oil" "marqué" dans de la graisse de beurre normale.

1. Colorimétrie directe

a) 10 gr de graisse ont été fondus à 60°C et dissous dans 20 ml d'éther de pétrole. On extrait par deux fois 5 cc de méthanol à 95%. On prélève 5 cc de la solution méthanolique, ajoute 10 cc de solution à 0,5% de borax et 5 cc de solution à 0,01% de 2 - 6 dichloroparabenzquinone 4 chlorimide à 0,01% dans l'alcool absolu. On observe la coloration par rapport à celle obtenue à partir d'un témoin.

Une coloration bleue perceptible apparaît pour la dilution à 10% de "butter oil" "marqué" dans un beurre normal, c'est-à-dire pour une dose de 0,001% de BHA. Elle s'accroît pour les concentrations supérieures, mais elle n'est pas en pratique décelable pour les concentrations inférieures.

b) La solution méthanolique contenant le BHA extrait de 20 gr de graisse est concentrée lentement au bain-marie, presque à sec, sans courant d'air. On ajoute ensuite 2 ml de méthanol, 8 ml de borax à 0,5% et 2 ml de réactif. La coloration bleue apparaît nettement pour la dilution de 5% de "butter oil" "marqué" dans un beurre normal mais n'est pas nette pour la dilution à 2,5%.

2. Chromatographie sur couche mince et colorimétrie

Des solutions méthanoliques extraites de 50 gr de beurre contenant des dilutions croissantes de B.H.A., correspondant à des mélanges de beurres normaux et de beurres "marqués" ont été examinées par chromatographie sur couche mince de gel de silice, avec le solvant de développement: hexane 80 - acide acétique 20 et le révélateur: 0,5% $\alpha\alpha$ 'dipyridile + 0,2% de chlorure ferrique dans l'alcool absolu.

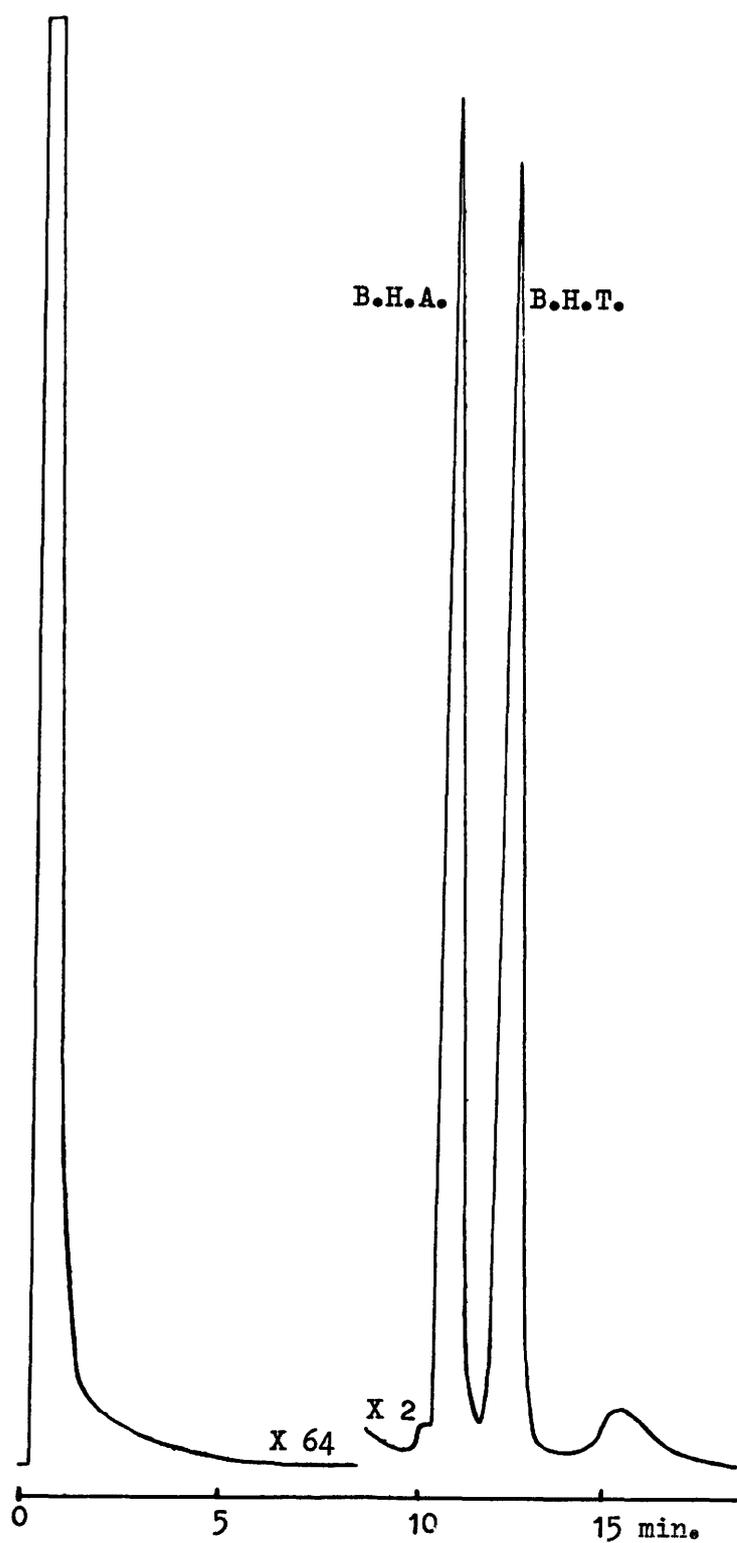
Les solutions méthanoliques sont évaporées lentement à sec au bain-marie et on reprend par un cc de méthanol à 95%. On dépose sur la plaque une prise d'essai de 100 microlitres et on procède à un développement de 10 cm dans l'obscurité avec le solvant indiqué. La plaque est séchée rapidement à l'air et soumise à la révélation. Les spots de B.H.A. qui se colorent en rouge ont, dans ces conditions, un Rf d'environ 0,4, mais la détection par cette méthode de moins de 5% de beurre "marqué" par 0,01% de B.H.A. dans du beurre normal reste problématique.

Le réactif de Gibs a été également utilisé comme révélateur. Ce dernier donne une coloration bleue lorsque les teneurs en B.H.A. sont assez conséquentes mais la coloration pâlit rapidement pour les concentrations faibles et cette réaction nous est apparue, dans ce cas, moins efficace que la réaction d'Emmérie Engel.

B) Chromatographie gazeuse

Etant donné sa volatilité, le B.H.A., de même d'ailleurs que le B.H.T. peuvent être déterminés par chromatographie gazeuse et la littérature fait mention de plusieurs techniques. On a d'abord procédé à une analyse en chromatographie gazeuse directement sur le solvant d'extraction (17) (18), mais les résidus huileux contaminent les colonnes. Aussi Schwien et al (19) préconisent-ils une purification de l'extrait huileux contenant un mélange d'antioxygènes par passage sur colonne d'alumine et élution au méthanol, avant chromatographie gazeuse sur une colonne apolaire telle qu'elle a été proposée par Takahashi (20). Hartman et Rose (21) injectent directement une solution huileuse dans le sulfure de carbone sur une précolonne dont une extrémité est garnie par un tampon de laine de verre. Deux colonnes, une colonne apolaire et une colonne polaire sont utilisées pour l'identification du B.H.A. et du B.H.T. et un standard interne est ajouté en vue d'une analyse quantitative. Cette technique est très rapide et extrêmement sensible puisqu'elle permet de déceler et de doser quelques p.p.m. de B.H.A. et de B.H.T. dans la prise d'essai, en utilisant l'undécanoate de méthyle comme standard interne. Cependant la précolonne doit être remplacée ou nettoyée tous les jours.

Fig. 1: Chrom. gazeuse d'un extrait méthanolique de beurre "marqué" par 0,01% de B.H.A. en présence de 0,01% de B.H.T.



Si on désire seulement mettre en évidence et non doser le BHA dans un "butter oil" on peut procéder à une extraction d'un volume de graisse par un volume de méthanol à 95%, injecter l'extrait méthanolique tel quel sur une seule colonne apolaire. Le BHT peut être utilisé comme standard interne. On a utilisé une colonne en acier inoxydable de 2 m de longueur et 3 mm de diamètre remplie avec une phase liquide constituée de 4% SE 52 sur Aeropak 100 - 120 mesh. La colonne a été raccordée, côté injecteur à une précolonne en acier inox (20 cm - 3 mm) bourrée, côté four, d'un tampon de laine de verre. L'appareil était un Aerograph modèle 1520, le détecteur un F.I.D., le gaz porteur de l'azote (40 ml/min); les températures étaient de 130°C pour la colonne, 250°C pour le détecteur et 250°C pour l'injecteur; le volume injecté était de l'ordre de 6 microlitres.

Dans ces conditions, les temps de rétention du BHA et du BHT sont respectivement de 11 et 12,5 minutes (Fig. 1).

La méthode permet de retrouver des quantités de l'ordre de 1 à 5 p.p.m. de BHA dans les graisses, mais à ce niveau la reproductibilité est insuffisante pour une exploitation quantitative des résultats. La précolonne peut être gardée pour une centaine d'injections; ensuite elle est remplacée et la colonne est reconditionnée une nuit à une température d'environ 300°C.

3. Conclusions

Il existe des tests qualitatifs très nombreux et éprouvés pour la mise en évidence du BHA dans les graisses. Des méthodes quantitatives sont également au point, mais elles sont assez longues et difficiles à exécuter dans le cas où il serait nécessaire d'obtenir une bonne précision pour des échantillons où la teneur en BHA serait de l'ordre de quelques p.p.m. D'autre part, des teneurs de quelques p.p.m. en BHA dans les "butter oils" sont susceptibles de disparaître rapidement par oxydation, sous l'influence d'un traitement industriel quelconque de la matière grasse. Des teneurs plus élevées disparaîtront au cours de la désodorisation.

Le BHA utilisé à la dose de 0,01% dans les "butter oils" posséderait donc des qualités analytiques suffisantes pour être un bon traceur, bien qu'il soit malaisé de le mettre en évidence et encore moins de le doser sur des quantités vingt fois moindres (5% de beurre "marqué" dans un beurre normal). Cependant, étant éliminable à la désodorisation, son utilisation en tant que traceur unique au cours d'une opération de "marquage" sera à rejeter.

N.B. Les antioxygènes sont la plupart du temps utilisés dans les corps gras avec des "synergistes" qui renforcent leur action et la rendent efficace. Ce

sont généralement des acides organiques et principalement l'acide citrique; ces composés sont facilement éliminés des corps gras au cours du raffinage alcalin et ne peuvent donc être utilisés comme traceurs de beurre.

2.3.3. Les agents émulsificateurs

Outre les colorants, les antioxygènes et leurs synergistes, l'industrie des corps gras alimentaires a recours pour ses besoins à une série d'agents permettant d'obtenir la présentation et les qualités souhaitées pour des corps gras purs ou émulsifiés ou des préparations dérivées de ceux-ci. Tels sont, en ordre principal, les agents émulsificateurs.

Les principaux agents émulsificateurs admis dans la composition des corps gras alimentaires sont les lécithines, les mono et diglycérides et les sucroglycérides. L'étude de ces composés a été abordée précédemment aux chapitres 2.2.III (les glycérides partiels), 2.2.IV (les sucroglycérides) et 2.2.V (les phosphatides).

Les législations européennes souffrent encore d'un manque de coordination et d'une certaine imprécision au sujet des émulsificateurs. Notons que des émulsificateurs non encore admis pour l'alimentation humaine contiennent des acides pratiquement absents dans le beurre, tels les acides acétique et sorbique. Ces acides peuvent être facilement mis en évidence dans les graisses, le premier par hydrolyse, distillation et titrage et le second, qui possède des doubles liaisons conjuguées, par spectrométrie U.V. Cependant, l'acide acétique n'est pas rigoureusement absent des beurres (22) et les acides conjugués y sont présents à des taux variables et significatifs de 0,3 à plus de 2% (23) (24).

2 - 3 Bibliographie

1. Kuzdzal- Savoie S.; Ann. Nutr. Alim. 13,A: 207 - 1959
2. Hugo D. et Causeret J.; XVII^e Congrès intern. de Laiterie C 2: 185 - 1966
3. Searles S.K. and Armstrong J.G.; J. Dairy Sci. 53: 150 - 1970
4. Casalis J., Chardon Y., Luquet F.M., Mainguy P., Watier B. et Yver M.;
Le Lait 513: 220 - 1972
5. Casalis J., Chardon Y., Luquet F.M., Mainguy P. et Yver M.; Le Lait 511:
28 - 1972
6. Swern D.; Bailey's industrial Oil and Fat Products 3^d Ed. 36: Interscience - New-York - 1964
7. Guyot A. et Jamotte P.; Informations internes sur l'Agriculture - Commission des Communautés Europ. Bruxelles 74: 1 - 1971
8. A.O.A.C. Methods 11 Ed. Antioxidants 330 - 1971
9. Copius - Peereboom J.W.; Dünnschicht Chromatographie, 2 Aufl. - Springer Verlag-Berlin - 601 - 1967
10. Randerath K.; Dünnschicht Chromatographie, 2 Aufl. - Verlag Chemie G.M.B.H. Weinheim - 186 - 1965
11. Mahon J.H. and Chapman R.A.; Anal. Chem. 23: 1116 - 1951
12. Anglin C., Mahon J.H. and Chapman R.A.; J. Agr. Food Chem. 4: 1018 - 1956
13. Sahasrabudhe M.R.; J.A.O.A.C. 47: 888 - 1964
14. Scheidt S.A. and Conroy H.W.; J. A.O.A.C. 49: 807 - 1966
15. Hurtubise R.J. and Latz H.W.; J. Agr. Food Chem. 18: 377 - 1970
16. Stuckey B.N., Osborne C.E.; J.Am. Oil Chemists' Soc. 42: 228 - 1966
17. Schwecke W.M. and Nelson J.H.; J. Agr. Food Chem. 12: 86 - 1964
18. BATTERY R.G., Stuckey W.M.; J. Agr. Food Chem. 9: 283 - 1961
19. Schwien W.G., Miller B.J. and Conroy H.W.; J. A.O.A.C. 49: 809 - 1964
20. Takahashi D.M.; J. A.O.A.C. 47: 367 - 1964
21. Hartman K.T. and Rose L.C.; J. Am. Oil Chemists'Soc. 47: 7 - 1970
22. James A.T. and Martin A.J.P.; Biochem. J. 63: 144 - 1956
23. Kuzdzal- Savoie S.; Le Lait 41: 606 - 1961
24. Riel R.R.; J. Dairy Sci. 46: 102 - 1963.
25. Bryant L.R. and Biggs D.A.; Can. Dairy Ice Cream J. 32: 27 - 1953

2.4. Composés de l'insaponifiable des huiles raffinées

Ces composés dont le raffinage n'enlève qu'une partie souvent minime sont les stérols, les alcools gras et les hydrocarbures du type squalène.

2.4.1. Les stérols

Les stérols végétaux naturels offrent de nombreuses possibilités de "marqueurs" pour le beurre. On peut imaginer que tout stérol végétal, à condition d'être facilement séparable du cholestérol par une technique chromatographique quelconque, peut constituer un traceur valable de la graisse butyrique. Nous avons vu au chapitre 2.2. que seuls le bêta sitostérol et le stigmastérol sont actuellement disponibles commercialement à un prix qui n'exclut pas des possibilités de "marquage" du beurre. Le brassicastérol et le campestérol pourraient donc également être utilisés mais les techniques de séparation par chromatographie gazeuse et la composition des stérols mineurs du beurre rendent leur mise en évidence plus malaisée que celle du stigmastérol et du sitostérol. Par contre le Δ^7 stigmastérol, stérol caractéristique de certaines huiles de composées, serait un excellent traceur s'il était commercialement disponible.

2.4.2. Les alcools gras

Les alcools gras, à l'état libre ou en combinaison dans les cires sont des constituants très importants des huiles marines (alcools aliphatiques). Les alcools terpéniques sont présents en quantités parfois importantes dans les huiles végétales (huiles de riz, de maïs, d'olive, etc.). Le lanostérol et le déhydrolanostérol ont été identifiés et dosés dans la matière grasse du lait; selon Schwartz et al, leur teneur atteindrait 1/60 du taux de cholestérol (1).

Les principaux alcools aliphatiques supérieurs risquent d'être enlevés à la vapeur sous vide poussé, mais non les alcools triterpéniques.

Les techniques de chromatographie sur couche mince permettent de séparer les principaux alcools terpéniques entre eux (2), mais l'identification semble plus facile par chromatographie gazeuse. Les principaux alcools terpéniques, comme le β amyryne, le butyrospermol, le cycloartérol sont séparables en chromatographie gazeuse sur colonne de silicone, dans les mêmes conditions qui ont été décrites pour les stérols.

Il n'est pas exclu qu'on puisse disposer commercialement un jour de certains alcools terpéniques, en particulier les amyrynes, à un prix acceptable pour le "marquage" de la graisse de beurre. Cependant, actuellement la production de ces substances est limitée à l'obtention de produits témoins très coûteux pour laboratoires.

2.4.3. Les hydrocarbures

Dans les huiles raffinées, les pigments étant en grande partie éliminés au raffinage, le principal hydrocarbure présent est généralement le squalène. La teneur de celui-ci est surtout importante dans les huiles de foie de poissons et également dans certaines huiles végétales comme l'huile d'olive (3). La graisse de beurre contient de 16 à 80 p.p.m. d'hydrocarbures éthyléniques, parmi lesquels le squalène (4). Des méthodes de détermination conventionnelles du squalène ont été codifiées, entre autres la méthode A.O.A.C. (5). En fait, par cette méthode, les hydrocarbures éthyléniques séparés de l'insaponifiable sur colonne d'alumine, sont dosés par iodométrie et le résultat est exprimé globalement en squalène.

Le squalène peut également être identifié et dosé après chromatographie gazeuse sur colonne de silicone des hydrocarbures de l'insaponifiable (6). Il est très sensible à l'oxydation; aussi sa teneur diminue-t-elle au cours de stockage des huiles, surtout dans des conditions propices à l'oxydation. Le squalène reste toujours présent dans les huiles raffinées, mais son taux tend à diminuer en fonction des divers traitements industriels subis par les corps gras. L'hydrogénation conduit à la formation de squalane. En raison principalement de sa dégradation rapide par oxydation et de sa transformation en squalane ou en ses dérivés par hydrogénation, il ne semble pas qu'on puisse retenir un jour l'utilisation du squalène comme traceur des beurres.

Le squalane ou squalène hydrogéné, étant moins facilement dégradable, offrirait sans doute des perspectives meilleures.

Un dosage rapide du squalane, à l'instar de ce qui a été fait pour le squalène (7) pourrait être effectué par chromatographie gazeuse. Les esters méthyliques du corps gras, préparés par méthanolyse, sont injectés directement sur une colonne de silicone à une température d'environ 230°C. Les esters méthyliques sont élués les premiers et ne gênent que très peu la détermination du squalène et du squalane élués par après. Cette technique serait simple et très rapide. Le beurre pourrait probablement être marqué par environ 1% de squalane. Etant donné la présence de traces d'hydrocarbures supérieurs dans la graisse de beurre et l'interférence possible des traces d'acides gras supérieurs, cette méthode doit cependant faire l'objet d'une mise au point attentive.

L'utilisation éventuelle du squalane comme traceur des beurres ne devrait pas poser de problème toxicologique puisqu'il est utilisé en pharmacie comme lubrifiant, comme ingrédient dans les suppositoires et comme support de

médicaments liposolubles. D'autre part, les techniques de désodorisation ne l'enlèvent pas entièrement des huiles.

En conclusion, le squalane pourrait être un traceur valable sur les plans biologique et analytique et son utilisation en vue du "marquage" des beurres pourrait être liée à des questions économiques.

2.4.4. Composés particuliers

Parmi ces produits, outre les antioxygènes naturels déjà mentionnés, nous relevons principalement certains composés mineurs de l'huile de sésame.

L'huile de sésame contient 0,4 à 1,1% de sésamine, 0,3 à 0,6% de sésamoline et des traces de sésamol.

Le sésamol ($C_7H_6O_3$) est le méthylènedioxy 3 - 4 phénol.

Les formules de la sésamoline, de la sésamine et de plusieurs de leurs isomères sont actuellement bien connues (8).

La sésamoline, de formule brute $C_{20}H_{18}O_7$, est le 2 (3 - 4 méthylène dioxyphénoxy) 6 (3 - 4 méthylène dioxiphényl) cis 3 - 7 dioxabicyclo 3 - 3 - 0 octane (Fig. 1).

La sésamine, de formule brute $C_{20}H_{18}O_6$, est le 2 - 6 (3 - 4 méthylènedioxyphényl) 3 - 7 dioxabicyclo 3 - 3 - 0 octane (Fig. 1).

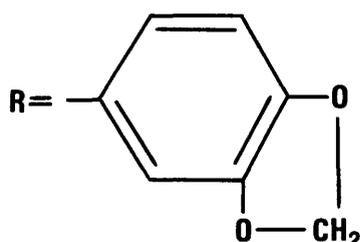
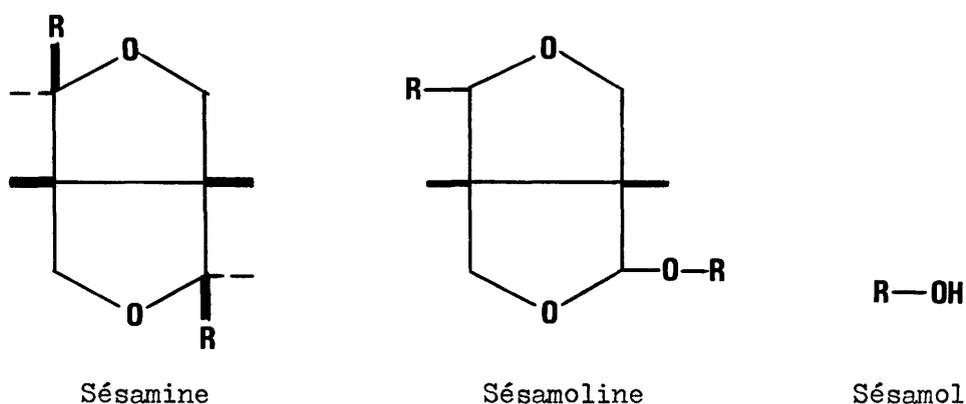


Fig. 1: Structures de la sésamine, de la sésamoline et du sésamol (9).

On sait que le sésamol peut être éliminé des corps gras par filtration sur terres décolorantes, par le raffinage alcalin ou par des méthodes de désodorisation et qu'il ne peut donc être considéré comme un bon traceur de la graisse butyrique (8) (10) (11) (12).

La sésamoline libère le sésamol par hydrolyse acide. Or, au cours de l'hydrogénation et lors du passage de l'huile sur certaines terres décolorantes acides ou sous l'effet d'autres processus industriels, la sésamoline libère le sésamol et sa teneur peut par conséquent être considérablement réduite dans les corps gras raffinés (8) (11) (13). La sésamoline, quoique plus efficace que le sésamol ne serait sans doute pas encore un traceur idéal.

La sésamine par contre résiste au raffinage et sa teneur ne diminue que très lentement au cours des traitements industriels de l'huile de sésame.

En vue du "marquage" des graisses, la sésamine serait donc un traceur très intéressant, puisque non éliminable et mis en évidence par des tests relativement simples (réaction de Fabris).

Les méthodes chromatographiques de séparation et de détermination des composés à noyau méthylène dioxypényl ont par ailleurs fait l'objet d'une revue récente (14). Après séparation en chromatographie sur couche mince et révélation par divers révélateurs, le seuil inférieur de la quantité de sésamoline et de sésamine nécessaire à l'identification serait de l'ordre de 0,1 à 0,2 microgramme.

Le problème majeur en ce qui concerne le choix des composés mineurs de l'huile de sésame comme traceurs du beurre paraît donc d'ordre économique. Mis à part le sésamol, dont le prix de revient du composé obtenu par synthèse, peut encore être accepté à la limite, il est pratiquement exclu qu'on puisse faire économiquement en vue du "marquage", la synthèse de la sésamine ou de la sésamoline. Il faudrait donc les isoler de l'huile de sésame, mais les méthodes industrielles actuelles ne pourraient pourvoir à l'obtention d'un produit commercial en quantité suffisante.

Le sésamol étant plus facilement et plus rapidement mis en évidence dans les corps gras que la sésamine, il serait peut être possible d'interesterifier du sésamol et des glycérides, ou de fabriquer un ester stable en milieu légèrement acide, de manière à obtenir un produit non éliminable au cours du raffinage ou de la désodorisation et identifiable par la réaction de Villavecchia après hydrolyse en milieu fortement acide.

2 - 4 Bibliographie

1. Schwartz D.P., Burgwald L.H., Shamey J. and Brevington C.R.; J. Dairy Sci 51: 929 - 1968
2. Capella P., De Zotti, Ricca, Valentini, Jacini E.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 37: 564 - 1960
3. Swern D.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products - 35 - 3^d Ed. Interscience - New-York - 1970
4. Von Ristow R., Woerner H.; Fette Seifen, Anstrich. 70: 278 - 1968
5. A.O.A.C. Methods - 11th Ed 457 - 1970
6. Wolff J.P.; Manuel d'analyse des corps gras - 188 - Azoulay Ed- 1968
7. Mordret F. et Dettaut C.; Rev. Fse Corps Gras 15: 605 - 1968
8. Budowski P.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 41: 280 - 1964
9. Lyon C.K.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 49: 245 - 1972
10. Guyot A., Jamotte P.; Informations Internes sur l'Agriculture - Commission des Communautés Européennes - Bruxelles 74: 1 - 1971
11. Budowski P. and Markley K.S.; Chem. Rev. 48: 125 - 1951
12. Beroza M. and Kinman M.L.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 32: 348 - 1955
13. Mathur L.B. and Tilara K.S.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 30: 447 - 1953
14. Fishbein L., Falk H.L. and Kotin P.; Chromatog. Rev. 10: 175 - 1968.

2.5. Les acides cyclopropéniques

Beaucoup d'huiles végétales, dont l'huile de coton et l'huile de kapok, contiennent parmi les acides gras des glycérides, de faibles quantités d'acides cyclopropéniques, parmi lesquels les plus généralement répandus sont l'acide malvalique (acide en C18) et l'acide sterculique (acide en C19).

L'huile de coton brute peut contenir de 1 à 2% d'acides cyclopropéniques (1) (2) (3), mais l'huile raffinée en contient beaucoup moins et généralement, pas plus de 0,6%.

Malgré ces faibles teneurs, la sensibilité du test colorimétrique d'Halphen est suffisante pour permettre le dépistage de faibles quantités d'huile de coton raffinée dans une autre huile végétale. La limite de sensibilité de ce test peut être portée en effet à environ 0,01% d'acides cyclopropéniques dans un corps gras. En pratique, on atteint facilement 0,020 à 0,025%. Le test d'Halphen est décrit dans tous les manuels d'analyse des corps gras et fait l'objet de méthodes officielles (4) (5).

Le dosage des acides cyclopropéniques peut être effectué par spectrophotométrie de la réaction colorée d'Halphen (6) ou par évaluation des halogènes fixés par ceux-ci après addition d'acide chlorhydrique ou d'acide bromhydrique (7) (8). Des techniques d'analyse par chromatographie gazeuse sont actuellement au point, mais au préalable, les acides doivent être hydrogénés ou transformés en dérivés avec divers réactifs (9) (10) et ces méthodes demandent des soins excessifs.

En fait, la réaction d'Halphen est à la base d'une méthode quantitative presque aussi sensible que les autres méthodes proposées et a l'avantage de donner un test qualitatif très sensible.

On peut donc envisager de produire industriellement des extraits d'huile de coton ou d'autres huiles végétales appropriées, enrichis en acides cyclopropéniques, de manière à disposer pour le "butter oil" d'un traceur facilement et rapidement mis en évidence.

Si la limite obtenue en pratique courante par les méthodes officielles pour la sensibilité de ce test est de l'ordre de 0,020 à 0,025% d'acides cyclopropéniques, il faudra tracer le "butter oil" par 0,5% d'acides cyclopropéniques purs pour permettre la mise en évidence de 5% de beurre tracé dans un beurre normal.

Cependant, les acides cyclopropéniques, même en faible dose, présentent certains effets biologiques désagréables en alimentation animale, et notamment une certaine modification de la composition en acides gras des graisses de réserve et une coloration accentuée du blanc d'oeuf chez les volailles (11).

Ces inconvénients disparaissent si ces acides sont inactivés (12). En conséquence, les procédés industriels modernes s'efforceront de les éliminer toujours davantage.

Etant très instables à la chaleur et à l'oxydation, la plus grande partie des acides cyclopropéniques des corps gras est éliminée facilement et cette élimination est effectuée d'abord au raffinage mais surtout au cours de la désodorisation.

Le chauffage à haute température (235°C) de l'huile de coton réactionnelle en présence d'acides gras libres de l'huile ou d'acide citrique ou phosphorique suffit à rendre négatif le test d'Halphen (13). Les techniques ordinaires de désodorisation ne sont en général pas suffisantes pour rendre négatif le test d'Halphen, mais les techniques de désodorisation à la vapeur sous vide poussé y pourvoient, en même temps qu'elles éliminent les acides organiques libres présents (14).

L'hydrogénation des graisses élimine également les acides cyclopropéniques, mais ceux-ci peuvent être touchés et éliminés par une hydrogénation sélective (15) (16). Outre leur instabilité et leur inactivation assez facile, les acides cyclopropéniques pourraient éventuellement présenter un autre inconvénient comme traceur. En effet, le test d'Halphen peut être positif pour les graisses de réserve d'animaux recevant du tourteau de coton dans leur régime alimentaire.

Conclusions

La rapidité et la simplicité d'exécution du test d'Halphen ne compensent pas les inconvénients que présentent les extraits d'huile de coton enrichis en acides cyclopropéniques comme traceurs du "butter oil".

Les inconvénients principaux sont incontestablement l'instabilité de ces produits et leur inactivation par la chaleur, mais il pourrait également y avoir des réticences biologiques, car si les effets d'une alimentation contenant ces acides en faible quantité ne paraissent pas être toxiques, ils sont néanmoins désagréables chez certains animaux. D'autre part, un test d'Halphen positif pourrait exceptionnellement être dû à la composition particulière du régime alimentaire. Enfin, la production économique du point de vue du "marquage" des beurres, de ces produits est loin d'être une garantie.

2 - 5 Bibliographie

1. Earle F.R., Melvin E.H., Mason L.H., Van Etten C.H., Wolff A.I. and Jones Q.
J. Am. Oil Chemists' Soc. 36: 304 - 1959
2. Shenstone F.S. and Vickery J.R.; Nature 190: 168 - 1961
3. Harris J.A., Magne F.C. and Scan E.L.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 41: 309 -
1964
4. A.O.A.C. Methods 11 Ed. 28.093: 463 - 1970
5. A.O.C.S. Official Method Cb 1: 25 - 1970
6. Deutschman A.J. and Klaus I.S.; Anal. Chem. 32: 1809 - 1960
7. Magne F.C., Harris J.A. and Skau E.L.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 40: 716 -
1963
8. Magne F.C., Harris J.A., Pittman R.A. and Skau E.L.; J. Am. Oil Chemists'
Soc. 43: 519 - 1966
9. Wilson T.L., Smith C.R. and Mikolajczak K.L.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 38:
696 - 1961
10. Schneider E.L., Loke S.P. and Hopkins D.T.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 45:
585 - 1968
11. Carter F.L. and Frampton V.L.; Chem. Rev. 64: 497 - 1964
12. Deutschman A.J., Berry J.W., Kircher H.W. and Sakir C.M.; J. Am. Oil Che-
mists' Soc. 41: 175 - 1964
13. Rayner E.T., Brown L.E. and Dupuy H.P.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 43: 113 -
1966
14. Eaves P.H., Dupuy H.P., Holzenthal L.L., Rayner E.T. and Brown L.E.; J. Am.
Oil Chemists' Soc. 45: 293 - 1968
15. Ward T.L., Tango J.S., Cousins E.R. and Feuge R.O.; J. Am. Oil Chemists' Soc.
44: 420 - 1967
16. Hutchins J.P., Ullman A.Z. and Going L.H.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 45:
397 - 1968.

2.6. Les acides conjugués et les acides trans.

Certains corps gras naturels peuvent contenir des proportions élevées d'acides conjugués ou d'acides trans (1), déterminables par des méthodes spectrométriques. Le problème relatif au "marquage" de la graisse butyrique par des graisses riches en acides conjugués a été abordé dans le chapitre 2.1.3.d.

Etant donné la présence ^{dans les beurres} de 0,4 à 2% d'acides diènes conjugués et de traces d'acides triènes conjugués (2) (3), les difficultés analytiques posées en vue de l'analyse par une méthode officielle en spectrométrie U.V. (4), vu l'instabilité relative de ces composés et leur oxydabilité, les triglycérides d'acides conjugués pourraient difficilement être utilisés comme traceurs du beurre.

La teneur en acides trans peut être estimée dans les margarines ou les shortenings par spectrométrie I.R. à condition que le total des acides conjugués soit inférieur à 5% des acides gras (5). Si les acides trans sont pratiquement absents des huiles alimentaires végétales courantes, il n'en va pas de même des graisses d'origine animale, principalement des graisses de ruminants.

Le beurre contient selon les saisons environ de 2 à 9% d'acides trans (6) (7).

Parmi les huiles naturelles contenant une forte proportion d'acides insaturés trans, il faut ranger l'huile de tung, l'huile de bois de Chine et l'huile d'officica, mais l'acide éléostéarique, un constituant essentiel auquel ces huiles doivent leurs propriétés siccatives est également un acide conjugué et l'utilisation de ces huiles siccatives comme traceurs est peu concevable.

Même s'il était possible d'obtenir une huile très riche en acides trans non conjugués par isomérisation des acides cis d'une huile alimentaire, la teneur naturelle trop élevée et trop variable de la graisse de beurre en acides trans interdirait une utilisation efficace des composés riches en acides trans comme traceurs de la graisse butyrique.

2.6. Bibliographie

1. Hopkins C.Y. and Chisholm M. J.; J. Am. Oil Chemists' Soc. 45: 176 - 1968
2. Riel R.; J. Dairy Sci. 46: 102 - 1963
3. Kuzdzal - Savoie S.; Rev. Fse Corps Gras 12: 461 - 1965
4. A.O.C.S. Official Method Cd 7: 58 - 1970
A.O.A.C. Methods 11 Ed; 450 - 1970
5. A.O.C.S. Tentative Method Cd 14: 61 - 1970
A.O.A.C. Methods 11 Ed; 453 - 1970
6. Kaufmann H.B., Volbert F. und Mankel G.; Fette, Seifen, Anstr. 63: 261 - 1961
7. Kuzdzal - Savoie S.; Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 5: 497 - 1965.

3. Les traceurs non lipidiques

3.1. Substances naturelles et substances non naturelles

Nous entendons par traceurs non lipidiques, des substances étrangères aux graisses alimentaires naturelles et préparées, ce qui exclut non seulement les lipides et les composés présents dans les corps gras alimentaires naturels, mais aussi les additifs utilisés par l'industrie des corps gras alimentaires. Ces traceurs non lipidiques pourront être des composés organiques isolés de produits naturels ou fabriqués par synthèse, ou des produits non naturels obtenus synthétiquement. Dans tous les cas cependant, le choix de traceurs efficaces pour le "marquage" de la graisse butyrique parmi ce type de substances soulèvera une série de problèmes difficilement solubles.

En premier lieu vient le problème biologique. L'effet biologique éventuel du traceur sera connu ou inconnu.

S'il est connu, cette connaissance doit être suffisante pour qu'on ne le soupçonne pas de pouvoir être désagréable.

S'il est inconnu, ce qui sera le cas en particulier de toutes les substances non utilisées en alimentation humaine, il est nécessaire de le tester, ce qui ne se conçoit guère si l'objectif est aussi limité que l'obtention d'un traceur du "butter oil".

On ne peut pas penser à l'utilisation comme traceurs, d'alcaloïdes ou de saponines dont on sait qu'ils ont un effet biologique souvent bien défini, à des hydrocarbures, à des composés oxygénés et, de manière générale, à des substances naturelles ou synthétiques dont on ignore tout de l'effet biologique et à propos desquelles on pourra émettre les soupçons les plus divers et les plus graves.

Tout aussi délicat est le problème économique. Il faut pouvoir isoler le produit choisi et cela avec un degré de pureté suffisant, ou éventuellement le synthétiser, de manière à pouvoir l'offrir sur le marché à un prix acceptable et en quantité suffisante pour le "marquage". D'autre part, les périodes de "marquage" des beurres excédentaires étant passagères, sporadiques et susceptibles de ne plus se renouveler dans une économie laitière redevenue saine, les firmes industrielles répugneront à s'engager dans la production d'une marchandise qui n'a pas un avenir commercial garanti.

Enfin, du point de vue analytique, même si le choix du traceur est effectué en fonction de l'obtention d'un test rapide et simple pour sa détection

rares sont les substances biologiquement non nocives, non lipidiques ou non solubles dans les lipides qu'on ne peut éliminer des corps gras ou du moins dont on ne peut réduire sensiblement le taux par des méthodes industrielles. En effet, si les extraits étherés des produits végétaux ou animaux peuvent contenir autre chose que les lipides classiques et toute la gamme des hydrocarbures, alcools, dérivés oxygénés, vitamines et pigments qui y sont solubles, ces autres composés peuvent le plus souvent être facilement séparés des graisses au raffinage, soit par précipitation (gommes, mucilages, matières pectiques), par extraction aux solutions aqueuses (sels, sucres), acidifiées (composés azotés basiques) ou alcalinisées (composés phénoliques, acides organiques), par des systèmes de désodorisation (aldéhydes, cétones, acides, alcools aliphatiques et hydrocarbures entraînaibles à la vapeur à 200°C sous vide poussé) ou par adsorption sur terres spéciales (pigments).

Beaucoup de produits, tels les alcaloïdes, les saponines, les glycolipides, les glucosides, ont des effets biologiques qui interdisent toute possibilité d'utilisation en tant que traceurs d'une matière grasse alimentaire.

En ce qui concerne les colorants, on est tenu de respecter les législations actuelles, lesquelles, d'une manière générale posent comme principe, l'interdiction de l'utilisation de substances de synthèse liposolubles non naturelles pour la coloration des corps gras alimentaires.

3.2. Les indicateurs titrimétriques

L'utilisation de certains indicateurs de pH a déjà été pressentie pour "marquer" les beurres dans certaines conditions (1) (2).

Ces indicateurs introduits en très faible quantité dans un beurre ordinaire (pH acide) virent lorsque l'on fait atteindre au pH un seuil déterminé, par addition d'une solution aqueuse basique.

La phénolphthaléine est certainement l'indicateur titrimétrique le plus universellement employé. Ce produit est connu et a jadis été utilisé en pharmacie pour ses propriétés purgatives; en conséquence, le problème biologique de son utilisation à dose très faible comme traceur, pourrait sans doute trouver une solution satisfaisante.

La phénolphthaléine a été proposée jadis par Subramanian et col. (1) comme traceur des graisses hydrogénées, afin de permettre une mise en évidence facile de celles-ci dans les "ghees". Elle est soluble dans les corps gras et n'est pas enlevée par la filtration sur noir animal ou sur terres décolorantes. Une dose de 0,01% de traceur, appliquée en solution alcoolique ou par dissolution directe dans la matière grasse fondue chaude, aurait été suffisante pour un "marquage" efficace (1).

La présence dans un beurre tracé d'un faible taux de phénolphtaléine ne s'aperçoit pas à la vue puisqu'elle ne produit aucune coloration aux pH acides des beurres. Cependant, si on fond la graisse de beurre ou si on la dissout dans un solvant organique, et si ensuite, on alcalinise le tout avec une solution basique, la solution ou du moins la phase aqueuse du mélange prend la teinte rouge caractéristique de l'indicateur en milieu alcalin. Malheureusement, pour extraire la phénolphtaléine d'un "butter oil" tracé par 0,01% de ce produit, il suffit, et nous l'avons expérimenté, de laver un volume de graisse tracée par un égal volume de solution de soude diluée (0,1N) et de séparer les phases aqueuses et grasses par centrifugation. La phase aqueuse contenant le radical chromogène apparaît colorée, tandis que la phase grasse dont l'indicateur est pratiquement éliminé garde sa coloration naturelle. La matière grasse est alors lavée à l'eau pour éliminer les savons. Elle est parfaitement récupérable pour l'industrie alimentaire. Cette technique qui, il y a vingt ans, avait pu paraître aux yeux de chercheurs indiens dispendieuse et pratiquement inutilisable, ne présente actuellement que peu de difficultés pour l'industrie laitière moderne.

Puisque la phénolphtaléine forme des dérivés ionisables et solubles dans les solutions aqueuses alcalines, on pourrait penser à pallier cet inconvénient en liant l'indicateur dans une molécule plus grande, non extractible en milieu aqueux. Le radical chromogène ne devrait être libéré que par l'action d'agents hydrolytiques très puissants comme les bases et les acides concentrés, susceptibles d'altérer en même temps la structure de la matière grasse et de rendre impossible son utilisation commerciale.

Malheureusement, le seul produit du commerce actuellement à notre disposition, le dibutyrate de phénolphtaléine, ne répond pas à ces critères. En effet, si ce produit est très soluble dans les matières grasses, il est également fort peu stable et s'hydrolyse très rapidement en milieu légèrement basique. Son extraction par des solutions aqueuses alcalines est moins facile que l'extraction de la phénolphtaléine; néanmoins, elle est toujours rapidement acquise après quelques lavages. Ce produit serait d'ailleurs extrêmement coûteux et son utilisation pour le "marquage" des beurres rendrait celui-ci d'autant moins économique que la quantité de traceur nécessaire à l'obtention du virage est de loin supérieure à celle de la phénolphtaléine. Par ailleurs, on ne connaît rien des incidences biologiques éventuelles de l'absorption d'une telle substance chez l'homme.

Non seulement les indicateurs acidobasiques classiques du type de la phénolphtaléine, du rouge de méthyle, de l'orangé de méthyle ou de l'alizarine, mais aussi les indicateurs pour titrage en milieu non aqueux, comme la thy-

molphtaléine, peuvent être éliminés des corps gras par extraction en milieu aqueux basique.

3.3. Les dérivés des acides aminés

Gulati et Kartha (3) ont testé, il y a vingt ans, la valeur du tyrosinate d'éthyle comme traceur devant permettre la mise en évidence de graisses hydrogénées dans du beurre. Une dose de 0,005% de cette substance, additionnée dans les graisses hydrogénées, permettrait de retrouver 5% de matière grasse tracée dans un beurre normal.

Si on considère le point de vue économique, le tyrosinate d'éthyle est actuellement fort cher et il n'est disponible qu'en très faibles quantités, car l'industrie ne le prépare que pour les maigres besoins des laboratoires de recherches. Néanmoins, sa préparation à partir de tyrosine est techniquement simple; si la demande venait à augmenter, il est certain que le prix diminuerait et que le "marquage" des beurres par une dose aussi infime que 0,005%, voire 0,01% de ce produit, deviendrait économiquement intéressant. Si on considère le point de vue biologique, l'addition aux doses exposées ci-dessus de tyrosinate d'éthyle comme traceur des beurres, ne devrait guère soulever de difficultés, puisque l'hydrolyse de ce composé donne des produits naturels parfaitement assimilables et que la tyrosine est d'ailleurs un acide aminé indispensable.

Enfin, du point de vue analytique, le tyrosinate d'éthyle est extractible des corps gras en milieu chlorhydrique. Si on se place uniquement sur le plan de la détection du traceur, l'extraction du tyrosinate d'éthyle de la graisse de beurre par des solutions chlorhydriques, la libération de la tyrosine par chauffage à reflux et la mise en évidence de celle-ci par la réaction diazoïque d'Ehrlich, sont des opérations si rapides, du moins fort simples. Cependant, si outre la facilité de la détection, on considère également l'efficacité du "marquage", le tyrosinate d'éthyle de même que les autres esters éthyliques des acides aminés courants, ne pourront certainement pas être de très bons traceurs des "butter oils", en raison des possibilités qui existent de les éliminer industriellement de ceux-ci, soit par extraction aux solutions chlorhydriques, soit par entraînement suivant des procédés de désodorisation à la vapeur sous vide poussé.

3.4. Les substances fluorescentes

Théoriquement, ces substances pourraient être utilisées comme traceurs visuels à détection très rapide. Il suffirait par exemple d'observer la fluorescence de la graisse tracée sous une lampe émettant dans l'U.V. Cependant,

certaines composés lipidiques peuvent présenter une fluorescence appréciable dès qu'on les soumet à des rayons U.V. D'autre part, de nombreuses substances solubles dans les corps gras, tels les caroténoïdes, les chlorophylles, les antioxygènes présentent une fluorescence importante. Pour cette raison, le degré de fluorescence des substances susceptibles d'être étudiées doit être particulièrement élevé.

Parmi les composés minéraux, les dérivés métalliques présentent des inconvénients pour la stabilité de la graisse et sont éliminables au raffinage. Parmi les composés organiques, la fluorescéine et ses dérivés (colorants de synthèse) sont extractibles par l'eau ou par les bases, tandis que les dérivés de la quinine ou de la quinoléine (dont l'éthoxyquine) sont extractibles par des solutions acides.

De toute manière, comme pour les colorants, même si on pouvait remédier à tous les inconvénients analytiques et économiques inévitables et produire une substance difficilement éliminable des corps gras par voie industrielle, le problème biologique et législatif demeurerait primordial; il faudrait encore établir l'innocuité biologique du produit choisi. Or, jusqu'à présent, l'addition d'éthoxyquine est permise dans la plupart des pays, uniquement comme additif en alimentation animale (taux max. de 0,015%) et, parmi les produits ou familles de produits cités, aucun n'est autorisé comme additif des corps gras destinés à la consommation humaine.

Les perspectives offertes par les substances fluorescentes pour le choix d'un traceur de la graisse butyrique destinée à la consommation humaine sont donc très maigres.

Comme pour tous les produits non naturels, on a peine à imaginer que l'industrie veuille isoler ou préparer des substances dont, par ailleurs, il faudra tester les effets biologiques, si les débouchés commerciaux sont aussi restreints et aussi incertains que ceux fournis pour le "marquage" périodique des excédents de graisse butyrique.

3. Bibliographie

1. Subramanian V., Srinivasan M. and Bhalerao V.R.; J. Sci. Ind. Research. 11: 277 - 1952
2. Bhalerao V.R. and Kummerow F.A.; J. Dairy Sci. 39: 956 - 1956
3. Gulati K.C. and Kartha A.R.S.; J. Sci. Ind. Research. 11 B: 346 - 1952.

4. Synthèse, perspectives générales en matière de choix de traceurs et conclusions générales.

4.1. Synthèse

4.1.1. Les substances expérimentées officiellement comme traceurs.

Ces substances ont été passées en revue dans la première partie de cette étude.

Les amidons, féculs, sucres et protéines ne sont pas à vrai-dire des traceurs des matières grasses dans lesquelles ils ne sont pas solubles. Le sésamol, la vanilline et les acides libres organiques sont extractibles au raffinage alcalin ou par des techniques de désodorisation.

L'éthoxyquine, autorisée seulement comme additif des corps gras destinés à la consommation animale, est extractible par des solutions acides, bien que l'extraction complète sans altération inacceptable du corps gras soit difficile.

Les chlorophylles sont peu stables, se dégradent rapidement, se dosent difficilement et s'adsorbent sur terres décolorantes.

Les substances aromatiques sont enlevées à la désodorisation.

L'huile de sésame, dont les qualités en tant que traceur sont assurées selon les tests officiels les plus connus, par la présence de sésamol et de sésamoline, voit les capacités réactionnelles de ces tests diminuer avec l'élaboration de plus en plus poussée du raffinage. D'autre part, le taux d'huile de sésame présente dans un beurre en tant que traceur, ne peut être contrôlé avec suffisamment de précision. L'huile de sésame étant moins coûteuse que la graisse butyrique, l'addition comme traceur, d'huile de sésame aux beurres serait intéressante économiquement et conduirait à des abus.

En réalité, de tous les traceurs utilisés jusqu'à fin 1971 pour le "marquage" de la graisse butyrique, seul le bêta sitostérol s'est révélé réellement efficace. Ce traceur est produit commercialement à un degré de pureté suffisant et à un prix acceptable. Son analyse, après isolement des stérols sous forme de digitonides et transformation éventuelle en acétates ou autres dérivés, ou libération des stérols libres, par chromatographie gazeuse, est simple et l'interprétation de cette analyse peut être suffisamment claire et conduit à un contrôle fort efficace. Notons que les bêta et gamma sitostérols ou 24 b et a éthylcholestérols ou plus simplement, selon la nomenclature officielle qui inclut les deux épimères, le Δ^5 stigmastène 3 β ol, possèdent des qualités identiques comme traceurs puisque l'analyse par chromatographie gazeuse sur colonne ordinaire ne les sépare pas et qu'ils sont dosés globalement.

4.1.2. Les substances lipidiques susceptibles d'être utilisées comme traceurs

L'étude relative à ces substances est décrite dans le chapitre 2.

Nous avons fait une distinction entre les corps gras naturels utilisables comme tels et certains éléments constitutifs de ceux-ci.

a) Les corps gras naturels

En ce qui concerne les corps gras naturels, l'huile de colza et l'huile de ricin s'imposent comme traceurs possibles en raison de leur composition particulière en acides gras ou en triglycérides.

L'huile de thé, par la composition de son insaponifiable, présente aussi des qualités de "marquage" intéressantes.

La présence d'huile de colza dans une graisse de beurre est facilement mise en évidence par chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides gras sur une phase apolaire, par la mesure du rapport C22:1/C22. Le contrôle donnerait lieu à très peu de contestations possibles et celles-ci pourraient être écartées par l'analyse des stérols.

La présence d'huile de ricin dans une graisse butyrique est encore plus simplement mise en évidence que celle d'huile de colza par chromatographie sur couche mince des glycérides. L'interprétation des résultats serait très aisée et ne pourrait pas être contestée.

L'huile de thé serait mise en évidence par la réaction de Fitelson concernant le butyrospermol; cependant, cette réaction n'est pas spécifique d'une huile végétale et une étude préalable de son utilisation éventuelle comme test pour le "marquage" des beurres n'a pas été entreprise. Les autres huiles naturelles, même l'huile de coton et l'huile de sésame, les huiles riches en acides insaturés à configuration trans ou en acides conjugués et les huiles marines présentent trop d'inconvénients pour pouvoir être utilisées avec efficacité comme traceurs.

L'inconvénient majeur, en tant que traceurs des beurres, de toutes les huiles alimentaires naturelles, même si certaines comme l'huile de colza et l'huile de ricin y échappent dans une certaine mesure, réside dans la difficulté d'obtenir une détermination suffisamment précise de leur teneur dans une graisse de beurre. Etant généralement beaucoup moins coûteuses que cette dernière, leur utilisation peut conduire à des abus.

b) Les éléments constitutifs des corps gras et les additifs industriels
Les triglycérides d'acides gras impairs inférieurs et les phytostérols (sitostérols et stigmastérol) sont, parmi les éléments constitutifs des

corps gras disponibles actuellement sur le plan commercial, les meilleurs traceurs de la graisse de beurre.

Les extraits huileux enrichis en tocophérols pourraient être utilisés comme traceurs grossiers, dépistables rapidement.

Comme traceur à détection rapide, on pourrait également utiliser, dans des conditions restreintes, il est vrai, l'huile de ricin hydrogénée, des monoglycérides industriels riches en monoglycérides totaux ou même du butylhydroxyanisol (B.H.A.).

D'autres substances comme des alcools terpéniques (butyrospermol, cycloarténol, amyrones), des hydrocarbures (squalane), des produits mineurs de divers huiles végétales (sésamine) ont des propriétés analytiques satisfaisantes comme traceurs, mais ne sont pas actuellement disponibles sur le plan commercial à un prix satisfaisant.

Les autres produits lipidiques naturels ou artificiels, tels les acides gras libres, les diglycérides, les sucroglycérides, les phosphatides, les alcools gras aliphatiques, les alcools mono ou diterpéniques, les matières colorantes ou émulsifiantes (additifs autorisés), les hydrocarbures naturels (caroténoïdes, squalène), les antioxydants naturels ou synthétiques autres que les tocophérols et le BHA, les produits mineurs de l'huile de sésame autres que la sésamine, les extraits huileux enrichis en acides cyclopropéniques, en acides trans ou en acides conjugués présenteraient des inconvénients majeurs si on voulait les utiliser comme traceurs de la graisse butyrique.

Parmi les triglycérides d'acides impairs inférieurs, nous accorderons un intérêt particulier aux triglycérides de l'acide énanthique (n heptanoïque) actuellement commercialement disponibles à des prix compétitifs pour le "marquage". Ces triglycérides sont préparés par intertestérification de glycérol pur et d'acide énanthique à 98% de pureté; ce dernier peut être obtenu à partir du "cracking" de l'huile de ricin.

La mise en évidence d'un taux anormal d'acide énanthique dans les acides gras du beurre est très simple et est effectuée par une méthode de chromatographie gazeuse universellement employée. Les méthodes de contrôle seraient ainsi plus généralement diffusées dans tous les pays si on "marquait" les beurres par des triglycérides d'acides impairs plutôt que par des stérols.

Le stigmastérol, sur le plan de l'efficacité du "marquage" est un traceur pratiquement aussi remarquable que les sitostérols. Analytiquement, sa détermination peut cependant être un peu plus malaisée et économiquement surtout, le prix du "marquage" serait plus élevé. Néanmoins, ce produit mérite certainement d'être retenu comme première option pour le choix

d'un traceur du beurre après celui des sitostérols et éventuellement après celui des triglycérides de l'acide énanthique.

Les tocophérols seraient des traceurs à dépistage rapide, très sensibles, mais oxydables et difficilement dosables avec une précision suffisante en contrôle courant. Etant donné leur présence en quantités minimales dans le beurre, leur dégradabilité et le manque de spécificité des tests rapides utilisés, l'interprétation des résultats pourra prêter à contestation si la quantité incluse dans les beurres "marqués" n'est pas très grande. Or, dans ce cas, le prix des concentrés de tocophérols commerciaux étant élevé, le "marquage" risque d'être économiquement inacceptable.

Parmi les raisons qui nous ont incités à écarter les principaux lipides naturels comme traceurs possibles pour la graisse de beurre, citons:

- a) leur présence naturelle à des taux significatifs dans la graisse de lait et leur instabilité thermique relative (glycérides partiels, acides conjugués, acides trans),
- b) leur élimination consécutive au raffinage (phosphatides, acides gras libres, acides cyclopropéniques, sésamol),
- c) leur instabilité thermique et leur hydrolyse possible conduisant à leur élimination (sucroglycérides, acides cyclopropéniques),
- d) leur dégradabilité thermique et oxydative et leur altération éventuelle à l'hydrogénation (acides cyclopropéniques, pigments, chlorophylles, antioxygènes naturels et synthétiques, squalène),
- e) leur élimination par des techniques de désodorisation (acides gras libres, sésamol, alcools aliphatiques, mono et diterpéniques, BHT, BHA, produits aromatiques),
- f) leur adsorption sur terres décolorantes (chlorophylles, caroténoïdes, pigments divers),
- g) leurs effets biologiques (gossypol),
- h) des difficultés analytiques diverses (stérides, cérides, lipides complexes).

Notons encore que le squalène, dégradable par oxydation et hydrogénable pourrait faire avantageusement place comme traceur au squalane.

Les alcools triterpéniques ne sont pas encore produits commercialement en quantités industrielles. Si, dans certains cas, la mise en évidence de ceux-ci peut être rapidement réalisée par des tests, en général, les analyses seront longues et onéreuses. A ce point de vue, l'utilisation des alcools triterpéniques comme traceurs risque d'être moins heureuse que celle des phytostérols.

Enfin, les tests relatifs à la détermination de la sésamine, composé mineur de l'huile de sésame, non éliminé au raffinage ou à la désodorisation, sont plus onéreux que ceux relatifs à la mise en évidence du sésamol ou de la sésamoline.

4.1.3. Les substances non lipidiques susceptibles d'être utilisées comme traceurs

Deux principes essentiels conditionnent l'utilisation éventuelle de substances non lipidiques comme traceurs de la graisse butyrique; ce sont la connaissance effective de leur effet biologique chez l'homme, à des doses normalement prévisibles après "marquage" et la solubilité dans les corps gras.

En effet, que ces substances non lipidiques soient naturelles ou non naturelles, si leur effet biologique chez l'homme est désagréable, inconnu ou même simplement incertain, la loi ne pourra qu'interdire leur utilisation comme additifs des corps gras destinés à la consommation humaine. Si ces substances ne sont pas ou sont très peu solubles dans les graisses, de manière générale, les méthodes industrielles les enlèveront d'autant plus aisément que la solubilité est faible.

Ainsi, ni les indicateurs titrimétriques courants, ni les indicateurs d'oxydo-réduction, ni les substances fluorescentes organiques ou minérales commerciales les plus connues ne seront des traceurs acceptables; ces substances sont en effet extractibles des corps gras par des méthodes industrielles et, par ailleurs, elles sont légalement interdites comme additifs des corps gras destinés à la consommation humaine.

4.2. Perspectives générales en matière de choix de traceurs de la matière grasse butyrique

4.2.1. Substances utilisées ou devant être utilisées incessamment (1972)

Parmi ces substances, le bêta sitostérol ou plus précisément les bêta et gamma sitostérols se sont révélés les traceurs de la matière grasse butyrique les plus efficaces. Leur utilisation doit donc être maintenue. Le choix du taux de 600 grammes/tonne proposé par le règlement C.E.E. n° 1259/72 du 16 juin 1972 est tout à fait rationnel et le taux est suffisant. Il serait cependant judicieux de définir ce type de traceur comme étant les 24 b et a éthylcholestérols (bêta et gamma sitostérols) ou mieux encore, comme le $\Delta 5$ stigmastène 3 β ol de formule brute $C_{29}H_{50}O$, et de prescrire une pureté commerciale minimale de 90% en ce produit.

Les triglycérides de l'acide énanthique sont un traceur nouveau, proposé par le règlement C.E.E. n° 1519/72 du 14 juillet 1972. Ce traceur a fait l'objet d'essais préliminaires entièrement satisfaisants, décrits dans

ce rapport, mais on n'en a pas encore éprouvé l'efficacité en contrôle courant. Les triglycérides de l'acide énanthique seraient un excellent traceur suivant les résultats de cette étude préliminaire. Ils sont disponibles commercialement à un prix avantageux pour le "marquage" par rapport à la plupart des autres traceurs. Comparée à celle obtenue avec les sitostérols, l'efficacité du "marquage" serait au moins aussi grande, mais les triglycérides de l'acide énanthique auraient l'avantage d'être décelés par une méthode d'analyse plus universellement diffusée dans les laboratoires de contrôle des denrées alimentaires. Le choix du taux de 1% de triglycérides d'acide énanthique est parfaitement judicieux, mais le degré de pureté aurait avantage à être plus clairement exprimé dans le règlement communautaire en 95% d'acide énanthique relativement aux acides gras totaux.

En ce qui concerne les graisses destinées à la consommation animale, le choix de 150 gr d'éthoxyquine par tonne, comme moyen de "marquage", bien que non entièrement satisfaisant, peut être maintenu en raison de motifs économiques (dénaturation à bas prix) et analytiques (contrôle visuel rapide sous rayons U.V.).

Notons que les autres traceurs utilisés sporadiquement pour "marquer" la graisse butyrique (sésamol, vanilline, acides inférieurs, dérivés du carotène, composés non gras) sont des traceurs peu efficaces en raison de leur élimination industrielle possible. Ce serait donc une lourde erreur de les utiliser, chacun séparément ou par groupes, comme unique traceur dans les beurres. Cependant, ils présentent un intérêt moyen en tant que substances décelables par des tests simples et rapides.

4.2.2. Substances utilisables dans l'immédiat ou dans des délais très rapprochés

En dehors des triglycérides de l'acide énanthique, commercialement disponibles et dont l'utilisation comme traceur est à peine commencée en pratique, mentionnons l'intérêt offert par certains autres triglycérides d'acides inférieurs impairs et surtout celui présenté par le stigmastérol. Parmi les huiles naturelles, signalons aussi les possibilités offertes par l'utilisation d'huile de colza et davantage par celle d'huile de ricin. L'obtention de triglycérides des acides valérique et pélargonique, acides parmi les plus intéressants comme élément "marqueur" des beurres, serait peut-être acquise fort rapidement, comme l'avait été celle de la triénanthine. Cependant, ceci n'est nullement certain, non à cause de la complexité des méthodes industrielles qui demeurent les mêmes, mais pour des raisons commerciales.

Le stigmastérol, par contre, est actuellement disponible dans le commerce

à un haut degré de pureté. Les méthodes de détermination sont au point; ce sont d'ailleurs les mêmes qui sont utilisées pour les sitostérols, ce qui confère à l'utilisation de ce produit comme traceur éventuel des beurres un avantage incontestable vis-à-vis d'autres substances que des stérols. Le prix de revient du stigmastérol est relativement beaucoup plus élevé et son dosage précis est plus difficile que celui des sitostérols. Aussi son utilisation éventuelle comme traceur ne s'impose-t-elle, à notre avis, qu'en deuxième option parmi les stérols, après celle des sitostérols. Dans ce cas, un taux minimum de 150 à 200 grammes de stigmastérol pur par tonne de beurre serait indispensable et un taux de 250 grammes de stigmastérol commercial à plus de 90% de pureté serait hautement souhaitable pour obtenir un "marquage" efficace.

L'huile de colza permet un "marquage" efficace de la graisse butyrique si elle est additionnée à un taux de 2,5% dans celle-ci. Néanmoins, la composition de l'huile utilisée doit être, dans certaines limites, imposée (40 à 50% d'acide érucique), ce qui constitue un handicap incontestable. Un deuxième handicap, surmontable il est vrai, mais qui, sans recours à des techniques analytiques fines, pourrait quand même donner lieu parfois à une contestation de l'interprétation des résultats, trouve son origine dans l'influence de certains régimes alimentaires spéciaux sur la composition de la graisse de lait en acide C22:1, cet acide constituant l'élément traceur de l'huile de colza. Enfin, il y a le handicap permanent des huiles alimentaires ordinaires, constamment beaucoup moins coûteuses que la graisse butyrique elle-même, ce qui peut inciter à l'addition excessive de traceurs; comme, dans une certaine mesure on peut contrôler mieux que pour les autres huiles végétales courantes, le taux d'huile de colza présent dans la graisse butyrique, ce handicap n'est pas non plus insurmontable.

L'huile de ricin naturelle serait sans doute un traceur plus remarquable que l'huile de colza. En effet, l'addition de 1% d'huile de ricin à la graisse butyrique serait suffisante pour la "marquer" et des tests analytiques simples sont mis au point pour permettre un contrôle rapide. Le problème de l'admission de 1% d'huile de ricin naturelle comme traceur est surtout psychologique car, à la dose où elle serait absorbée par l'homme, elle ne produirait pas d'effet cathartique. Dans certains cas, on pourrait également utiliser l'huile de ricin hydrogénéé, exempte de tout effet cathartique, mais dont le point de fusion élevé rend la dispersion homogène difficile dans une graisse butyrique.

4.2.3. Substances actuellement non économiquement disponibles mais présentant de bonnes qualités analytiques comme traceurs éventuels

Ces substances seront naturelles ou non naturelles, mais en tout cas, il est toujours nécessaire de connaître leur action biologique.

En ce qui concerne les substances naturelles, nous porterons essentiellement notre choix sur celles qui sont présentes et consommées dans certains corps gras alimentaires, pour lesquelles on ne connaît donc pas d'effets biologiques néfastes. Nous mentionnerons particulièrement le $\Delta 7$ stigmasténol parmi les stérols, le butyrospermol, les amyriines, le cycloarténol parmi les alcools terpéniques, le squalane parmi les hydrocarbures et les différents tocophérols parmi les composés à action vitaminique. Signalons aussi la sésamine, un produit mineur de l'insaponifiable de l'huile de sésame et dans une mesure moindre la sésamoline libérant à l'hydrolyse du sésamol.

En ce qui concerne les substances non naturelles, obtenues par synthèse, nous retiendrons uniquement celles qui, en principe, se comportent biologiquement comme des produits naturels connus. Citons tous les ^{tri}glycérides d'acides gras présents en quantité inférieure à 0,1% dans la graisse butyrique, que ces acides gras soient des acides impairs à chaîne droite (C5, C9) ou ramifiée (C5 iso) et mêmes des acides alcools (acide ricinoléique). Le sésamol pourrait être lié dans une fonction organique aussi stable à l'hydrolyse que les liaisons glycéridiques, afin d'empêcher son élimination au raffinage, mais la fabrication d'un tel produit et son utilisation dans les matières grasses alimentaires risque de poser des problèmes industriels, commerciaux et biologiques difficiles.

Signalons enfin que, abstraction faite du problème biologique, les méthodes industrielles modernes de raffinage et de purification des corps gras, rendent peu probable à brève échéance, l'obtention d'un traceur efficace nouveau, non éliminable économiquement de la graisse butyrique, parmi les colorants, les substances fluorescentes, les indicateurs titrimétriques ou d'oxydo-réduction, les antioxygènes de synthèse et même les émulsifiants et les dérivés des acides aminés.

4.3. Conclusions générales

Actuellement, deux traceurs remarquablement efficaces peuvent être utilisés pour "marquer" la matière grasse butyrique; ces traceurs dont les avantages respectifs s'équilibrent sensiblement sont, d'une part, les sitostérols, ou plus précisément, le $\Delta 5$ stigmastène 3 β ol de formule brute $C_{29}H_{50}O$ et d'autre part les triglycérides de l'acide énanthique.

Si la nécessité de disposer d'un troisième traceur s'imposait, on pourrait prévoir l'utilisation à très court terme du stigmastérol. Celui-ci aurait l'avantage d'être analytiquement déterminable par les mêmes méthodes que les sitostérols et l'inconvénient d'être plus coûteux.

A très brève échéance, l'huile de colza et surtout l'huile de ricin pourraient être également retenues, mais ces huiles alimentaires moins chères que la graisse butyrique, peuvent favoriser dans une certaine mesure, un "marquage" frauduleux par excès de traceurs.

A moins brève échéance, il faut citer les possibilités offertes par les triglycérides des acides valérique et pélargonique, à la condition préalable que l'industrie les produise économiquement, en quantités suffisantes, et avec une pureté garantissant leur innocuité biologique.

A plus longue échéance, on pourrait s'orienter si nécessaire, vers le choix d'alcools triterpéniques, de sésamine, de squalane ou peut-être de ^{tyrosinate} d'éthyle. Il n'existe aucun traceur à détection très rapide, du type "traceur visuel" qui "marque" avec efficacité la graisse butyrique, entendons surtout par là, aucun traceur visuel qui ne puisse être éliminé au moins dans sa plus grande partie par des procédés industriels économiques.

Parmi les traceurs non visuels, à mise en évidence rapide par tests, qui sont actuellement disponibles, signalons en premier lieu, l'huile de ricin. Plus discutables, pour des motifs d'interprétation analytique ou à cause des possibilités industrielles d'extraction des corps gras, viennent ensuite les tocophérols ou les extraits huileux enrichis en tocophérols et le butylhydroxyanisol (BHA) en ce qui concerne les graisses "marquées" destinées à la consommation humaine, et l'éthoxyquine en ce qui concerne les graisses "marquées" destinées à la consommation animale. L'intérêt principal de ces substances réside dans le fait qu'on pourrait les utiliser comme traceurs d'appoint, rapidement décelables, à côté d'un traceur analytique.

Dans un avenir plus lointain, le butyrospermol, s'il devient commercialement et économiquement disponible, pourra être un excellent traceur à mise en évidence rapide.

Il est évident que tout choix d'un traceur nouveau nécessitera des essais préliminaires nombreux et une étude préalable des modalités du "marquage".

Principaux ouvrages consultés

- Andersen A.J.C.; Refining of Oils and Fats for edible purpose - Pergamon Press
L.T.D., London 1953
- Boekenhoogen H.A.; (Editor) Analysis and characteristics of Oils and Fat Products,
Vol. 1 - 2 - Interscience, London 1964
- Brink M.F. and Kritchevsky D.; Dairy Lipids and Lipid Métabolism - The Avi Pu-
blishing Company, Inc. - Westport, Connecticut 1968
- Cocks L.V. and Van Rede G.; Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts - Academie
Press, London 1966
- Copius Peereboom J.W.; Chromatographic Sterol Analysis as applied to the Inves-
tigation of Milk, Fat and other Oils and Fats - Centrum voor Landbouwdocu-
mentatie - Wageningen, Nederland 1963
- Gruger E.H.; Marine Oils - Ed. M.E. Stansby - The Avi Publishing Co. - Wesport,
Connecticut 1967
- Gunstone F.D.; An Introduction to the Chemistry of Fats and Fatty Acids - London
Chapman and Hall L.T.D. 1958
- Handbuch der Lebensmittelchemie - Band IV - Fette und Lipide (Lipids) - Sprin-
ger Verlag, Berlin 1969
- Hilditch T.P.; The Chemical Constitution of Natural Fats - 4th Ed. Chapman and
Hall - London 1964
- Holman R.T.; Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids Vol. XII - Per-
gamon Press, Oxford 1972
- Lecoq R.; Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles - Ed. Doin,
Paris VI 1965
- Long K.; Biochemie der Ernährung - Steinkopff Verlag, Darmstadt 1970
- Manuel Suisse des denrées alimentaires 5^e Ed. - Centrale fédérale des imprimés,
Berne 1969
- Markley F.K.; Fatty Acids - Sec. Ed. - Interscience, New-York 1964
- Mehlenbacher V.C.; The Analysis of Oils and Fats - Garrard Press. Champaign, Ill
1960
- Official and tentative methods of the American Oil - Chemist's Society 3^d Ed.
Chicago, Illinois 1970
- Official methods of Analysis of the Association of Official - Analytical Che-
mists 11 Ed. - Washington D.C. 20044
- Pointurier H., Adda J.; Beurrerie industrielle - La Maison rustique, Paris 6^e

- Randerath K. Thin - Layer Chromatography - Academic Press, New-York 1964
- Stahl E.; Dünnschicht chromatographie - Springer Verlag, Berlin 1967
- Swern D; Bailey's Industrial Oil and Fat Products 3 Ed. - Interscience, New-York
1964
- Weisseyre R.; Techniques Laitières Modernes - La Maison rustique, Paris 6^e 1969
- Wachs W.; Oile und Fette, I Teil, Analyse der Nahrungsfette - Verlag A.W. Hayns
Erlen, Berlin 1961
- William K.A.; Oils, Fats and Fatty Foods - Churchill, London 1950
- Wittcoff H.; The Phosphatides - Reinhold Publishing Corp., New-York 1951
- Wolf; Manuel d'Analyse des Corps Gras - Azoulay, Paris 1968

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Introduction	1
Le "marquage" de la matière grasse butyrique à l'aide de traceurs	3
1. Les substances utilisées comme traceurs	5
1.1. Les révélateurs des margarines	5
1.1.1. Les amidons comme révélateurs	5
1.1.2. L'huile de sésame comme révélateur	6
1.2. Les traceurs utilisés pour la matière grasse butyrique	7
1.2.1. Les traceurs prévus par les règlements C.E.E. 1390/69 et 1732/69	7
a) Le sésamol	8
b) La vanilline	8
c) Le bêta sitostérol	8
d) L'éthoxyquine	8
e) La chlorophylle E 140	9
1.2.2. Autres traceurs utilisés sporadiquement	9
1.3. Les mélanges de matière grasse butyrique et de substances non grasses	10
1.4. Les aromes acides des "Ghee"	10
2. Les traceurs lipidiques	12
2.1. Les corps gras alimentaires comme traceurs des beurres	13
2.1.1. Les corps gras déterminables dans les beurres par une réaction colorée spécifique	13
a) L'huile de sésame	13
b) L'huile de coton	13
c) Les huiles de kapok, de baobab et de thé	14
2.1.2. Les corps gras déterminables dans les beurres par la nature de leurs fractions lipidiques	14
a) Les triglycérides	14
b) Les glycérides partiels	15
c) Les phosphatides	15
d) Les stérides et les cérides	16
e) Les lipides complexes	16
2.1.3. Les corps gras déterminables dans les beurres par leur composition en acides gras	16
a) L'huile de coton	18
b) L'huile d'arachide	18

c) L'huile de colza	18
d) Les huiles riches en acides conjugués (tung, oïtica)	19
e) L'huile de ricin	20
f) Les huiles marines	21
2.1.4. Les corps gras déterminables dans les beurres par la composition de l'insaponifiable	22
a) Les graisses déterminables dans le beurre par leur composition en stérols	23
b) Les graisses déterminables dans le beurre par leur composition en tocophérols	23
c) Les graisses déterminables dans le beurre par la composition en alcools gras	24
d) Les corps gras déterminables dans le beurre par la composition en hydrocarbures	25
e) Les corps gras pouvant être caractérisés par la composition particulière en pigments, vitamines et composés spéciaux	25
2.2. Les composés lipidiques commerciaux	26
I. Les triglycérides des corps gras naturels ou hydrogénés	27
I.A. L'huile de ricin	28
1. Choix du traceur	28
1.1. Le problème biologique	28
1.2. Le problème économique	30
1.3. Le problème analytique	30
2. Contrôle de l'huile de ricin	30
2.1. La composition en acides gras	30
2.2. La composition en glycérides	31
3. Choix du taux de traceur	36
4. Contrôle des beurres tracés	37
5. Elimination de l'huile de ricin de la graisse de beurre	38
6. Conclusions	38
I.B. L'huile de ricin hydrogénée	39
1. Choix du traceur	39
1.1. Le problème biologique	39
1.2. Le problème économique	40
1.3. Le problème analytique	40
2. Contrôle de l'huile de ricin hydrogénée	40
2.1. La composition des acides gras	40
2.2. La composition des glycérides	42

3. Choix du taux de traceur	42
4. Contrôle des beurres tracés	42
4.1. Méthodes analytiques	42
4.2. Observations empiriques	43
5. Elimination de l'huile de ricin hydrogénée de la graisse de beurre	43
6. Conclusions	44
Bibliographie	45
II. Les triglycérides préparés industriellement	46
Choix du traceur	46
1.1. Le problème biologique	47
a) Utilisation biologique des acides impairs	47
b) Innocuité des acides impairs	48
1.2. Le problème économique	49
1.3. Le problème analytique	50
1.3.1. Méthode analytique et fondements de la méthode de contrôle	50
1.3.2. Les triglycérides de l'acide énanthique (n heptanoïque)	51
a) Propriétés générales	51
b) Contrôle du traceur	52
1.3.3. Choix du taux de traceur	53
1.3.4. Techniques d'analyse et de contrôle par chromatographie gazeuse	54
a) Chromatographie gazeuse sur colonne apolaire	54
b) Chromatographie gazeuse sur colonne polaire	54
c) Avantages et inconvénients des deux techniques de chromatographie	55
1. L'utilisation des colonnes apolaires	55
2. L'utilisation des colonnes polaires	58
1.3.5. Contrôle de la présence du traceur dans la matière grasse butyrique	58
1.4. Considérations économiques	59
1.5. Conclusions	60
Bibliographie	62
III. Les glycérides partiels et les monoglycérides	63
1. Choix du traceur	63
1.1. Le problème biologique	64
1.2. Le problème économique	66

1.3. Le problème analytique	66
2. Choix du taux de traceur	67
3. Contrôle du monoglycéride	68
4. Contrôle du "marquage"	68
5. Mise en évidence des monoglycérides dans les beurres	72
- Chromatographie sur couche mince de gel de silice des glycérides	72
6. Variation de la composition glycéridique des beurres sous l'influence de divers facteurs	73
7. Elimination des monoglycérides des matières grasses	74
8. Conclusions	74
9. Cas particulier	76
Les monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée	76
9.1. Composition et mise en évidence du produit commercial	76
9.2. Avantages et inconvénients des monoglycérides de l'huile de ricin hydrogénée comme traceurs	76
Bibliographie	79
IV. Les sucroglycérides	80
1. Définition et propriétés	80
2. Les sucroglycérides comme traceurs	81
2.1. Etude toxicologique	81
2.2. Etude économique	81
2.3. Etude analytique	81
3. Le "marquage" de la graisse de beurre par des sucro- glycérides	82
4. Elimination des sucroglycérides des graisses	84
Bibliographie	85
V. Les phosphatides	86
1. Définition et propriétés	86
2. Les phosphatides comme traceurs	87
Bibliographie	89
VI. Les phytostérols: le stigmastérol	90
Les stérols des corps gras alimentaires	90
Le stigmastérol	91
1. Choix du traceur	91
1.1. Le problème biologique	91
1.2. Le problème économique	91
1.3. Le problème analytique	92

2. Le stigmastérol: définition et propriétés générales	92
3. Les stigmastérols commerciaux	93
3.1. Spécificités commerciales	93
3.2. Contrôle des stigmastérols commerciaux	93
4. Méthodes analytiques de détermination du stigmastérol dans la matière grasse	94
4.1. Le dosage des stérols totaux	94
4.2. Le point de fusion des acétates de stérols	95
4.3. Analyse qualitative des stérols	95
5. Le "marquage" du beurre par le stigmastérol	95
5.1. Analyse qualitative du stigmastérol commercial par chromatographie gazeuse	95
5.2. Choix du taux de traceur	96
5.2.1. Taux à préconiser en fonction de la mesure du point de fusion des acétates	96
5.2.2. Choix en fonction de l'analyse en chromatographie gazeuse	102
6. Elimination du stigmastérol de la graisse butyrique	103
7. L'emploi du stigmastérol comme traceur de la matière grasse butyrique et la mise en évidence des corps gras d'origine végétale	103
8. L'utilisation comparée du bêta sitostérol et du stigmastérol en tant que traceurs de la graisse butyrique	104
8.1. Point de vue commercial	104
8.2. Point de vue analytique	104
9. Conclusions	106
Bibliographie	107
VII. Les tocophérols	108
1. Les tocophérols des corps gras	108
2. Les tocophérols en tant que traceurs du beurre	110
2.1. Le problème biologique	110
2.2. Le problème économique	111
2.3. Le problème analytique	111
2.4. Dosage du tocophérol apparent dans le "butter-oil"	112
3. Les concentrés commerciaux de tocophérols	113
4. Choix du taux de traceur	116
5. Dosage du tocophérol apparent dans les beurres tracés	117

6. Elimination du traceur de la graisse butyrique	118
6.1. L'autoxydation	118
6.2. Le raffinage	119
7. Substitution des tocophérols par d'autres substances à caractère antioxygène	120
8. Conclusions	120
Bibliographie	122
2.3. Les additifs des corps gras	123
2.3.1. Les matières colorantes	123
2.3.2. Les antioxygènes	125
Le B.H.A.	126
1. Le B.H.A., traceur économique à dépistage rapide	126
2. Mise en évidence du B.H.A. dans les beurres "marqués"	127
A. Tests colorimétriques	127
1. Colorimétrie directe	127
2. Chromatographie sur couche mince et colorimétrie	128
B. Chromatographie gazeuse	128
3. Conclusions	130
2.3.3. Les agents émulsificateurs	131
Bibliographie	132
2.4. Composés de l'insaponifiable des huiles raffinées	133
2.4.1. Les stérols	133
2.4.2. Les alcools gras	133
2.4.3. Les hydrocarbures	134
2.4.4. Composés particuliers	135
Bibliographie	137
2.5. Les acides cyclopropéniques	138
Bibliographie	140
2.6. Les acides conjugués et les acides trans.	141
Bibliographie	141
3. Les traceurs non lipidiques	142
3.1. Substances naturelles et substances non naturelles	142
3.2. Les indicateurs titrimétriques	143
3.3. Les dérivés des acides aminés	145
3.4. Les substances fluorescentes	145
Bibliographie	146

4. Synthèse, perspectives générales en matière de choix de traceurs et conclusions générales	147
4.1. Synthèse	147
4.1.1. Les substances expérimentées officiellement comme traceurs	147
4.1.2. Les substances lipidiques susceptibles d'être utilisées comme traceurs	148
a) Les corps gras naturels	148
b) Les éléments constitutifs des corps gras et les additifs industriels	148
4.1.3. Les substances non lipidiques susceptibles d'être utilisées comme traceurs	151
4.2. Perspectives générales en matière de choix de traceurs de la matière grasse butyrique	151
4.2.1. Substances utilisées ou devant être utilisées incessamment (1972)	151
4.2.2. Substances utilisables dans l'immédiat ou dans des délais très rapprochés	152
4.2.3. Substances actuellement non économiquement disponibles, mais présentant de bonnes qualités analytiques comme traceurs éventuels	154
4.3. Conclusions générales	154
Principaux ouvrages consultés	156
Table des matières	158

Informations internes sur L'AGRICULTURE

		Date	Langues
N° 1	Le boisement des terres marginales	juin 1964	F ⁽¹⁾ D ⁽¹⁾
N° 2	Répercussions à court terme d'un alignement du prix des céréales dans la CEE en ce qui concerne l'évolution de la production de viande de porc, d'œufs et de viande de volaille	juillet 1964	F ⁽¹⁾ D ⁽¹⁾
N° 3	Le marché de poissons frais en république fédérale d'Allemagne et aux Pays-Bas et les facteurs qui interviennent dans la formation du prix du hareng frais	mars 1965	F ⁽¹⁾ D ⁽¹⁾
N° 4	Organisation de la production et de la commercialisation du poulet de chair dans les pays de la CEE	mai 1965	F ⁽¹⁾ D ⁽¹⁾
N° 5	Problèmes de la stabilisation du marché du beurre à l'aide de mesures de l'Etat dans les pays de la CEE	juillet 1965	F D
N° 6	Méthode d'échantillonnage appliquée en vue de l'établissement de la statistique belge de la main-d'œuvre agricole	août 1965	F ⁽¹⁾ D ⁽²⁾
N° 7	Comparaison entre les « trends » actuels de production et de consommation et ceux prévus dans l'étude des perspectives « 1970 » 1. Produits laitiers 2. Viande bovine 3. Céréales	juin 1966	F ⁽¹⁾ D
N° 8	Mesures et problèmes relatifs à la suppression du morcellement de la propriété rurale dans les Etats membres de la CEE	novembre 1965	F ⁽¹⁾ D
N° 9	La limitation de l'offre des produits agricoles au moyen des mesures administratives	janvier 1966	F D
N° 10	Le marché des produits d'œufs dans la CEE	avril 1966	F ⁽¹⁾ D ⁽¹⁾
N° 11	Incidence du développement de l'intégration verticale et horizontale sur les structures de production agricole – Contributions monographiques	avril 1966	F ⁽¹⁾ D
N° 12	Problèmes méthodologiques posés par l'établissement de comparaisons en matière de productivité et de revenu entre exploitations agricoles dans les pays membres de la CEE	août 1966	F ⁽¹⁾ D
N° 13	Les conditions de productivité et la situation des revenus d'exploitations agricoles familiales dans les Etats membres de la CEE	août 1966	F D
N° 14	Situation et tendances des marchés mondiaux des principaux produits agricoles – « bovins – viande bovine »	août 1966	F D
N° 15	Situation et tendances des marchés mondiaux des principaux produits agricoles – « sucre »	février 1967	F D ⁽¹⁾
N° 16	Détermination des erreurs lors des recensements du bétail au moyen de sondages	mars 1967	F ⁽¹⁾ D ⁽³⁾

⁽¹⁾ Epuisé.

⁽²⁾ La version allemande est parue sous le n° 4/1963 de la série « Informations statistiques » de l'Office statistique des Communautés européennes.

⁽³⁾ La version allemande est parue sous le n° 2/1966 de la série « Informations statistiques » de l'Office statistique des Communautés européennes.

		Date	Langues
N° 17	Les abattoirs dans la CEE I. Analyse de la situation	juin 1967	F D
N° 18	Les abattoirs dans la CEE II. Contribution à l'analyse des principales conditions de fonctionnement	octobre 1967	F D
N° 19	Situation et tendances des marchés mondiaux des principaux produits agricoles – « produits laitiers »	octobre 1967	F D ⁽¹⁾
N° 20	Les tendances d'évolution des structures des exploitations agricoles – Causes et motifs d'abandon et de restructuration	décembre 1967	F D
N° 21	Accès à l'exploitation agricole	décembre 1967	F D
N° 22	L'agrumiculture dans les pays du bassin méditerranéen – Production, commerce, débouchés	décembre 1967	F D
N° 23	La production de produits animaux dans des entreprises à grande capacité de la CEE – Partie I	février 1968	F D
N° 24	Situation et tendances des marchés mondiaux des principaux produits agricoles – « céréales »	mars 1968	F D
N° 25	Possibilités d'un service de nouvelles de marchés pour les produits horticoles non-comestibles dans la CEE	avril 1968	F D
N° 26	Données objectives concernant la composition des carcasses de porcs en vue de l'élaboration de coefficients de valeur	mai 1968	F D
N° 27	Régime fiscal des exploitations agricoles et imposition de l'exploitant agricole dans les pays de la CEE	juin 1968	F D
N° 28	Les établissements de stockage de céréales dans la CEE – Partie I	septembre 1968	F D
N° 29	Les établissements de stockage de céréales dans la CEE – Partie II	septembre 1968	F D
N° 30	Incidence du rapport des prix de l'huile de graines et de l'huile d'olive sur la consommation de ces huiles	septembre 1968	F D
N° 31	Points de départ pour une politique agricole internationale	octobre 1968	F D
N° 32	Volume et degré de l'emploi dans la pêche maritime	octobre 1968	F D
N° 33	Concepts et méthodes de comparaison du revenu de la population agricole avec celui d'autres groupes de professions comparables	octobre 1968	F D
N° 34	Structure et évolution de l'industrie de transformation du lait dans la CEE	novembre 1968	F D
N° 35	Possibilités d'introduire un système de gradation pour le blé et l'orge produits dans la CEE	décembre 1968	F D
N° 36	L'utilisation du sucre dans l'alimentation des animaux – Aspects physiologiques, technologiques et économiques	décembre 1968	F D

(1) Epuisé.

		Date	Langues
N° 37	La production de produits animaux dans des entreprises à grande capacité de la CEE – Partie II	février 1969	F D
N° 38	Examen des possibilités de simplification et d'accélération de certaines opérations administratives de remboursement	mars 1969	F D
N° 39	Evolution régionale de la population active agricole – I : Synthèse	mars 1969	F D
N° 40	Evolution régionale de la population active agricole – II : R.F. d'Allemagne	mars 1969	F D
N° 41	Evolution régionale de la population active agricole – III : Bénélux	avril 1969	F D
N° 42	Evolution régionale de la population active agricole – IV : France	mai 1969	F
N° 43	Evolution régionale de la population active agricole – V : Italie	mai 1969	F D
N° 44	Evolution de la productivité de l'agriculture dans la CEE	juin 1969	F D en prép.
N° 45	Situation socio-économique et perspectives de développement d'une région agricole déshéritée et à déficiences structurelles – Etude méthodologique de trois localités siciliennes de montagne	juin 1969	F I ⁽¹⁾
N° 46	La consommation du vin et les facteurs qui la déterminent – R.F. d'Allemagne	juin 1969	F D
N° 47	La formation de prix du hareng frais dans la Communauté économique européenne	août 1969	F D
N° 48	Prévisions agricoles – I : Méthodes, techniques et modèles	septembre 1969	F D
N° 49	L'industrie de conservation et de transformation de fruits et légumes dans la CEE	octobre 1969	F D
N° 50	Le lin textile dans la CEE	novembre 1969	F D
N° 51	Conditions de commercialisation et de formation des prix des vins de consommation courante au niveau de la première vente – Synthèse, R.F. d'Allemagne, G.D. de Luxembourg	décembre 1969	F en prép. D
N° 52	Conditions de commercialisation et de formation des prix des vins de consommation courante au niveau de la première vente – France, Italie	décembre 1969	F D en prép.
N° 53	Incidences économiques de certains types d'investissements structurels en agriculture – Remembrement, irrigation	décembre 1969	F D
N° 54	Les équipements pour la commercialisation des fruits et légumes frais dans la CEE – Synthèse, Belgique et G.D. de Luxembourg, Pays-Bas, France	janvier 1970	F

(¹) Cette étude n'est pas disponible en langue allemande.

		Date	Langues
N° 55	Les équipements pour la commercialisation des fruits et légumes frais dans la CEE – R.F. d'Allemagne, Italie	janvier 1970	F
N° 56	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale I. Autriche	mars 1970	F D
N° 57	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale II. Danemark	avril 1970	F D
N° 58	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale III. Norvège	avril 1970	F D
N° 59	Constatation des cours des vins de table à la production I. France et R.F. d'Allemagne	mai 1970	F D en prép.
N° 60	Orientation de la production communautaire de viande bovine	juin 1970	F D en prép.
N° 61	Evolution et prévisions de la population active agricole	septembre 1970	F D
N° 62	Enseignements à tirer en agriculture d'expérience des «Revolving funds»	octobre 1970	F D
N° 63	Prévisions agricoles II. Possibilités d'utilisations de certains modèles, méthodes et techniques dans la Communauté	octobre 1970	F D
N° 64	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale IV. Suède	novembre 1970	F D
N° 65	Les besoins en cadres dans les activités agricoles et connexes à l'agriculture	décembre 1970	F D
N° 66	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale V. Royaume-Uni	décembre 1970	F D
N° 67	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale VI. Suisse	décembre 1970	F D
N° 68	Formes de coopération dans le secteur de la pêche I. Synthèse, R.F. d'Allemagne, Italie	décembre 1970	F D en prép.
N° 69	Formes de coopération dans le secteur de la pêche II. France, Belgique, Pays-Bas	décembre 1970	F D en prép.
N° 70	Comparaison entre le soutien accordé à l'agriculture aux Etats-Unis et dans la Communauté	janvier 1971	F D
N° 71	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale VII. Portugal	février 1971	F D
N° 72	Possibilités et conditions de développement des systèmes de production agricole extensifs dans la CEE	avril 1971	F D
N° 73	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale VIII. Irlande	mai 1971	F en prép. D

		Date	Langues
N° 74	Recherche sur les additifs pouvant être utilisés comme révélateurs pour la matière grasse butyrique – Partie I	mai 1971	F ⁽¹⁾ D en prép. ⁽¹⁾
N° 75	Constatation de cours des vins de table II. Italie, G.D. de Luxembourg	mai 1971	F D en prép.
N° 76	Enquête auprès des consommateurs sur les qualités de riz consommées dans la Communauté	juin 1971	F D I
N° 77	Surfaces agricoles pouvant être mobilisées pour une réforme de structure	août 1971	F D
N° 78	Problèmes des huileries d'olive Contribution à l'étude de leur rationalisation	octobre 1971	F I en prép.
N° 79	Gestion économique des bateaux pour la pêche à la sardine – Recherche des conditions optimales – Italie, Côte Méditerranéenne française I. Synthèse	décembre 1971	F I
N° 80	Gestion économique des bateaux pour la pêche à la sardine – Recherche des conditions optimales – Italie, Côte Méditerranéenne française II. Résultats des enquêtes dans les zones de pêche	décembre 1971	F I
N° 81	Le marché foncier et les baux ruraux – Effets des mesures de réforme des structures agricoles I. Italie	janvier 1972	F D en prép.
N° 82	Le marché foncier et les baux ruraux – Effets des mesures de réforme des structures agricoles II. R.F. d'Allemagne, France	janvier 1972	F D en prép.
N° 83	Dispositions fiscales en matière de coopération et de fusion d'exploitations agricoles I. Belgique, France, G.D. de Luxembourg	février 1972	F
N° 84	Dispositions fiscales en matière de coopération et de fusion d'exploitations agricoles II. R.F. d'Allemagne	février 1972	D
N° 85	Dispositions fiscales en matière de coopération et de fusion d'exploitations agricoles III. Pays-Bas	février 1972	N
N° 86	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale IX. Finlande	avril 1972	F en prép. D
N° 87	Recherche sur les incidences du poids du tubercule sur la floraison du dahlia	mai 1972	F D en prép.
N° 88	Le marché foncier et les baux ruraux – Effets des mesures de réforme des structures agricoles III. Pays-Bas	juin 1972	F
N° 89	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale X. Aperçu synoptique	Septembre 1972	F en prép. D

(1) Etude adressée uniquement sur demande.

		Date	Langues
N° 90	La spéculation ovine	Septembre 1972	F D en prép.
N° 91	Méthodes pour la détermination du taux d'humidité du tabac	Octobre 1972	F D en prép.
N° 92	Recherches sur les révélateurs pouvant être additionnés au lait écrémé en poudre	Octobre 1972	F ⁽¹⁾ D en prép. ⁽¹⁾
N° 93	Nouvelles formes de collaboration dans le domaine de la production agricole - I : Italie	Novembre 1972	F en prép. D en prép. I
N° 94	Nouvelles formes de collaboration dans le domaine de la production agricole - II : Benelux	Décembre 1972	F en prép. D en prép. N
N° 95	Nouvelles formes de collaboration dans le domaine de la production agricole - III : R.F. d'Allemagne	Décembre 1972	F en prép. D
N° 96	Recherche sur les additifs pouvant être utilisés comme révélateurs pour la matière grasse butyrique - Partie II	Janvier 1973	F ⁽¹⁾ D en prép. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Etude adressée uniquement sur demande.

