
Informations internes sur L'AGRICULTURE

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

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*

APERÇU DES PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DE L'ÉTUDE

RECHERCHE SUR LES ADDITIFS POUVANT ÊTRE UTILISÉS COMME REVELATEURS POUR LA MATIÈRE GRASSE BUTYRIQUE

Série : Informations internes sur l'Agriculture

n° 74

Ce rapport vient de paraître en langue française.
La version allemande est en préparation.

ÉTANT DONNÉ SON CARACTÈRE TRÈS SPÉCIALISÉ, IL NE
SERA ADRESSÉ QU'ÀUX PERSONNES QUI EN FERONT LA
DEMANDE.

Le rapport se divise en deux parties principales, une étude analytique détaillée et une étude comparative avec synthèse et conclusions. L'étude analytique comporte un chapitre réservé à chaque traceur. Après description des propriétés des traceurs et des méthodes analytiques utilisées, une partie essentielle de chacun de ces chapitres traite des possibilités pratiques d'élimination du traceur de la matière grasse.

La recherche entreprise concerne essentiellement les six traceurs ou groupes de traceurs suivants :

- 1.- Le sésamol
- 2.- La vanilline
- 3.- Le bêta sitostérol
- 4.- Les chlorophylles (dont la chlorophylle E 140)
- 5.- L'éthoxyquine ou santoquin
6. Les triglycérides dénaturés (dont le miglyol 812 et l'huile de colza).

./.

Les principaux résultats de la recherche peuvent être résumés comme suit :

- Le sésamol a des qualités analytiques très valables, mais il est coûteux et les procédés de raffinage et de désodorisation l'éliminent facilement des corps gras;
- La vanilline et surtout les chlorophylles sont à prescrire comme traceurs en raison de leur extraction très facile des corps gras par des procédés de raffinage, les chlorophylles ayant en outre le désavantage d'une certaine instabilité et d'une analyse quantitative difficilement précise;
- L'éthoxyquine est un traceur très sensible et de mise en évidence facile et rapide. Des techniques élaborées parviennent à l'éliminer des corps gras, mais l'élimination complète et économique de ses dérivés fluorescents est difficile;
- Parmi les triglycérides naturels, si les miglyols sont à rejeter, l'huile de colza, à condition d'en bien définir la qualité, les modalités d'utilisation et les techniques d'analyse, pourrait constituer un très bon traceur de la graisse de beurre;
- Enfin, le sitostérol (bêta et gamma) est pratiquement et sélectivement le moins éliminable de la matière grasse butyrique et paraît donc être le meilleur des six traceurs étudiés.

=====

/ ADDENDUM / CORRIGENDUM /

=====

à l'étude :

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

"Informations Internes sur l'Agriculture" N° 74

Introduction - 1ère page - 6ème ligne

lire :.....(triglycérides d'acides gras à chaîne moyenne)...
au lieu de : (triglycérides d'acide gras à chaîne moyenne)...

Introduction - 2ème page - ajouter à la fin :

Dans le texte de cette étude, le terme "dénaturation" a été utilisé quelle que soit la destination du produit traité.

Par celui-ci il faut entendre le "marquage" ou le "traçage" de la graisse butyrique plutôt qu'un changement notable de sa nature.

En réalité le beurre dénaturé, c'est-à-dire tracé par addition de quantités infimes de produits non-toxiques à l'alimentation humaine, est utilisable sans restriction pour celle-ci.

Page 114 b - 3ème diagramme en bas et à gauche :

lire : Beurre normal + 5 % beurre dénaturé
par 3 % d'huile de colza
(1,5 ‰ huile de colza)
au lieu de : (1,5 % huile de colza)

Informations internes sur L'AGRICULTURE

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

COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES

DIRECTION GENERALE DE L'AGRICULTURE

DIRECTION «ECONOMIE ET STRUCTURE AGRICOLES» – DIVISION «BILANS, ETUDES, 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 concerne l'étude des révélateurs pouvant être additionnés à la matière grasse butyrique.

Cette étude a été confiée par la Direction Générale de l'Agriculture des Communautés Européennes à la Station Laitière de l'Etat à Gembloux - Belgique (Ministère de l'Agriculture - Administration de la Recherche Agronomique), et elle a été entreprise sous la direction du Professeur Emile PIRAUX, Directeur et Président de la Personnalité Juridique (P.J.) de cet organisme.

Les enquêtes scientifiques, les recherches bibliographiques, les études analytiques et les essais technologiques, réalisés en vue de cette recherche, sont l'oeuvre commune de plusieurs membres du personnel scientifique et technique de la Station.

Monsieur André GUYOT, Chef de Travaux à la Section de chimie et de physique, a été le principal responsable et exécutant de la plupart des études, analyses et essais.

Messieurs J.M. ISTACE et J. BRASSEUR, préparateurs-techniciens à la Section de chimie et physique, ainsi que Mademoiselle M. COLIN, préparatrice technique à la P.J. ont collaboré activement aux recherches. Madame C. JOIRIS, sténo-dactylographe a été chargée du travail de bureau.

Monsieur E. PIRAUX, atteint par la limite d'âge au 31/3/70, a été admis à la retraite à cette date. Néanmoins, après son départ le 1/4/70, il a continué à s'intéresser de très près à la poursuite de l'étude commencée et il a eu la bienveillance de nous conseiller judicieusement.

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

Le Président de la P.J.

P. JAMOTTE.

Gembloux, le 25 mai 1971.

INTRODUCTION

Le présent rapport concerne l'étude de cinq révélateurs ayant fait l'objet d'une réglementation communautaire (C.E.E.), à savoir le sésamol, la vanilline, le bêta sitostérol, la chlorophylle E 140, l'éthoxyquine et l'étude de deux révélateurs possibles choisis parmi les triglycérides naturels, le miglyol 812 (triglycérides d'acide gras à chaîne moyenne) et l'huile de colza.

Il comporte deux parties principales, une partie analytique et descriptive et un aperçu synthétique avec conclusions générales.

L'objet de la partie analytique est de mettre en évidence par des travaux de nature technico-expérimentale, les qualités et les défauts de chaque produit et la possibilité de les utiliser comme traceurs de la matière grasse butyrique.

L'absence de toxicité aux doses préconisées comme traceurs, dans leur domaine respectif d'utilisation, étant considérée comme un fait acquis pour chacun de ces produits, un chapitre essentiel de cette première partie sera constitué par l'examen des techniques possibles et économiques d'élimination des traceurs des corps gras, car l'existence de ces techniques conditionnera, le plus souvent davantage que la sensibilité des méthodes analytiques, l'acceptabilité de chaque substance comme révélateur; la recherche d'un révélateur nouveau, parmi les triglycérides naturels, a d'ailleurs été envisagée, non seulement en raison de critères biologiques et analytiques, mais aussi, et ce critère n'est pas moins essentiel, en raison de son élimination économiquement impraticable de la matière grasse butyrique.

Dans cette première partie, chaque révélateur a fait l'objet d'une étude séparée.

La deuxième partie de l'étude consiste en un aperçu synthétique des recherches effectuées et de leurs résultats avec les contingences économiques, cette synthèse étant conçue de manière à en dégager les conclusions qui s'imposent.

Dans cette deuxième partie, selon leur utilisation respective, les révélateurs ont été rassemblés, pour comparaison, en trois groupes:

- 1) le sésamol, la vanilline et le bêta sitostérol, révélateurs dont l'utilisation a été prévue par certains règlements communautaires pour les graisses butyriques dénaturées destinées à l'alimentation humaine;

- 2) Les chlorophylles et l'éthoxyquine, révélateurs dont l'utilisation a été prévue par certains règlements communautaires pour les graisses butyriques dénaturées destinées à l'alimentation animale;
- 3) Les triglycérides d'acides gras naturels (miglyol et huile de colza), révélateurs possibles pour les graisses butyriques dénaturées destinées soit à l'alimentation humaine, soit à l'alimentation animale.

Enfin, des conclusions générales auxquelles nous avons joint nos considérations personnelles sur le problème de la dénaturation des beurres sont tirées de l'ensemble des travaux effectués.

D'autre part, cette étude a été entreprise alors qu'était en vigueur la réglementation C.E.E. concernant certains traceurs, tels le sésamol, la vanilline, le bêta sitostérol, l'éthoxyquine et la chlorophylle E 140. Cette réglementation est actuellement abrogée. Il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus et les conclusions qu'on a pu en tirer gardent toute leur valeur, particulièrement si, à l'avenir, une dénaturation importante de la matière grasse butyrique s'impose encore dans les pays de la C.E.E.

Le Chef de Travaux,

A. GUYOT,

SOMMAIRE

	<u>Page</u>
Introduction	
A. Etude analytique	1
I. Le sésamol	1
II. La vanilline	20
III. Le bêta sitostérol	37
IV. Les chlorophylles	55
V. L'éthoxyquine	83
VI. Les triglycérides naturels	103
VI. 1. Le miglyol	105
VI. 2. L'huile de colza	110
B. Synthèse et conclusions générales	121
1. Utilisations comparées du sésamol, de la vanilline et des sitostérols en tant que traceurs de la matière grasse buty- rique	121
1.1. Tableau synoptique	122
1.2. Conclusions	125
2. Utilisations comparées des chlorophylles et de l'éthoxyquine en tant que traceurs de la matière grasse butyrique	130
2.1. Tableau synoptique	131
2.2. Conclusions	134
3. Utilisations comparées du miglyol et de l'huile de colza en tant que traceurs de la matière grasse butyrique	138
3.1. Tableau synoptique	140
3.2. Conclusions	141
4. Conclusions générales	142

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

A. ETUDE ANALYTIQUE

I. LE SESAMOL

Note préalable

La réglementation prescrite par la Commission agricole des Communautés européennes, relative à la vente de beurres ou de graisses butyriques tracées (règlement C.E.E. n° 1390/69) fixe les révélateurs et stipule leurs doses à ajouter dans certaines conditions aux beurres. Ces doses sont exprimées en grammes par tonne de beurre. Il faut noter cependant que les révélateurs utilisés sont, avant tout, des traceurs de la matière grasse, dans laquelle ils sont particulièrement solubles. Il serait donc plus logique et plus simple d'exprimer ces doses en grammes par tonne de matière grasse butyrique. Dans un souci de précision, afin d'être conforme à la lettre du règlement, nous avons donc considéré que le beurre contient officiellement 82% de matière grasse et une grande partie de nos essais a été effectuée sur la base de cette composition légale du beurre. Dans ce cas, les doses prescrites de révélateurs se partagent, pour la plus grande partie, entre les 820 kg de graisse butyrique et pour une part beaucoup plus faible, mais analytiquement non négligeable, surtout pour la vanilline, entre les 180 kg de non-beurre.

Pour des raisons de simplicité et de facilité d'exécution du travail, nous avons cependant considéré également pour une autre partie de nos essais, que les doses prescrites étaient exprimées en grammes par tonne de matière grasse butyrique, ce qui correspond sans doute à l'esprit du règlement.

Il est à noter que les "butter oils" que nous avons reçus avaient été tracés suivant cette dernière conception. De ce fait, la teneur en vanilline et en sésamol de la matière grasse des beurres tracés analysés était nettement supérieure (10 à 20%) à la teneur en vanilline et en sésamol des "butter oils" tracés.

Quant au β sitostérol, les doses prescrites ont été étudiées uniquement dans les "butter oils" ou les beurres concentrés: le sitostérol étant pratiquement insoluble dans l'eau, on peut considérer qu'il se répartit uniquement dans la phase grasse du beurre.

1. Propriétés générales du sésamol

Le sésamol est un composé phénolique, à caractère légèrement acide de formule brute $C_7 H_6 O_3$. C'est le 3-4 méthylènedioxy phénol, $C_6 H_3 OH (CH_2 O_2)$.

Il est très soluble dans l'alcool, moins soluble dans les graisses et peu soluble dans l'eau.

Son point de fusion est de $64^{\circ}4C$. Nous n'avons pas trouvé de références dans la littérature concernant son point d'ébullition.

Le sésamol utilisé comme traceur de la matière grasse butyrique ou sésamol "Stanlex" est fourni par la firme américaine "Joseph Stanley Company" River Forest, Illinois 60305. Ce sésamol "Stanlex" est garanti pur et stable avec un point de fusion de 64 à $66^{\circ}C$. Le point de fusion observé pour notre part, est de $64^{\circ}3C$ et correspond donc bien à ces données. Nous avons également observé le point d'ébullition. Celui-ci est de l'ordre de $264 - 266^{\circ}C$.

Le sésamol pur est synthétisé par oxydation du pipéronal par l'acide péracétique (1) et il est purifié par cristallisation et sublimation. Cette dernière propriété est très importante, car elle pourra être à la base d'une technique d'élimination du sésamol d'une matière grasse.

Le sésamol qui ne serait pas préparé suivant la technique ci-dessus est généralement moins pur et peut donc présenter des points de fusion inférieurs et une coloration moindre au test de Villavecchia (2).

Le sésamol possède une action antioxydante (réducteur) marquée et il est parfois utilisé comme anti-oxydant dans le saindoux et dans diverses huiles végétales (2). A l'état naturel, le sésamol a particulièrement été mis en évidence dans l'huile de sésame, où on le rencontre sous forme libre et sous forme liée (sésamoline). Une molécule de sésamoline libre par hydrolyse acide une molécule de sésamol. Par le sésamol libéré après hydrolyse, la sésamoline réagit donc positivement au test de Villavécchia.

La conservation du sésamol "Stanlex" dans la graisse de beurre est garantie par la firme productrice, dans des conditions normales de stockage, pendant 10 à 20 ans. La "Joseph Stanley Company" donne également le tableau suivant concernant les quantités de sésamol "Stanlex" nécessaires pour révéler de faibles pourcentages de "butter oil" tracé avec du sésamol, dans une matière grasse butyrique normale.

1. Budowski P. J. Am. Oil Chemists' Soc. 27 - 264 - 7 (1950)
2. Suarez, O'Connor, Field, Bickford - Analytical Chemistry 24 - 4 - 668 (1952).

Grammes de sésamol Stanlex par 1000 kg de butter oil	% de butter oil décelable dans une matière grasse butyrique normale par le test de Villavecchia
500 gr	0,35%
250 gr	0,70%
167 gr	1,05%
125 gr	1,40%
100 gr	1,75%
75 gr	2,30%
50 gr	3,50%

De ce tableau, retenons principalement les taux de 100 gr et 50 gr à la tonne puisqu'il s'agit de taux qui ont été incorporés réellement dans des beurres ou "butter oils" à tracer.

Ces taux permettraient donc de retrouver respectivement 1,75 et 3,5% d'un "butter oil" tracé dans une graisse butyrique normale.

2. Méthodes analytiques de détermination du sésamol dans les graisses

Le sésamol, composé phénolique, réagit avec les réactifs des phénols tel le réactif de Folin-Denis, mais d'autres substances peuvent réagir avec ces réactifs, particulièrement la vanilline qui est également un traceur à caractère phénolique.

La méthode de base pour la détermination du sésamol est toujours le test préconisé par Villavecchia et Fabris (1893) ou méthode dérivée de celle-ci.

La réaction de Villavecchia est elle-même dérivée du test encore plus ancien de Baudoin.

La réaction de Baudoin consistait à faire réagir la matière grasse avec du saccharose en présence d'acide chlorhydrique. La présence d'huile de sésame (sésamol) était révélée par la coloration rosée que prenait le mélange (B.S. 684: 1958).

Dans le test de Villavecchia, le sucre est remplacé par une solution alcoolique du furfural. Le test de Villavecchia est plus sensible et de loin plus généralement utilisé que le test de Baudoin. La coloration rose obtenue est spécifique du sésamol et une réponse positive au test de Villavecchia établit de manière non ambiguë la présence de sésamol dans la graisse analysée.

La méthode de Villavecchia est reprise dans de nombreuses normes internationales telles que celles élaborées par:

l'A.O.A.C. 9e éd. 1960 - 376

l'A.O.C.S. méth. Ch 2 - 40 (SL 1009 - 438)

le D.G.F. ... et dans de nombreux ouvrages classiques.

L'application du test de Villavecchia s'est effectuée suivant de nombreuses variantes.

Dans cette étude, nous avons utilisé les diverses variantes suivantes:

2.1. Méthode officielle belge de contrôle de la présence d'huile de sésame dans les margarines (A.R. du 11.4.1960 paru au Moniteur belge du 20.8.1960).

2.1.1. Description de la méthode

Lorsqu'on agite pendant 30 secondes un mélange porté à une température de 30 à 40 degrés centigrades et formé de 5 ml de paraffine liquide (Ph.B.IV) contenant 20% en volume de matière grasse du produit fini et de 5 ml d'acide chlorhydrique de densité comprise entre 1,15 et 1,17 avec 5 gouttes de solution incolore d'alcool éthylique à 94° contenant 2% de furfurool, la couche acide doit endéans 5 minutes, offrir une coloration au moins égale à celle que présente, observée dans les mêmes conditions d'examen, la phase aqueuse d'un mélange obtenu en ajoutant 50 ml d'eau distillée contenant 0,15 ml de solution décimale de permanganate de potassium et 0,5 ml de solution décimale de bichromate de potassium à 50 ml de paraffine liquide, (Ph. B. IV.)

2.1.2. Application de la méthode à différents mélanges de matière grasse butyrique contenant des doses croissantes de sésamol

Le test officiel, mais sans emploi de paraffine, a été appliqué à des doses croissantes de sésamol, soit 2,5, 5, 7,5, 10, 100 gr/tonne.

La coloration de la phase aqueuse a été examinée au spectrophotomètre Lumétron, 402 E muni d'un filtre de 515 nm.

Les solutions ont été examinées dans les tubes en verre de 160 x 16 mm.

On a pris comme témoin (100% de transmission) la phase aqueuse obtenue avec une matière grasse pure.

Le témoin officiel préconisé par la législation belge pour le contrôle de la présence d'huile de sésame dans les margarines (voir ci-dessus) a également été examiné suivant cette méthode.

Les résultats suivants ont été enregistrés:

<u>Concentr. en sésamol gr/tonne</u>	<u>% de transmission</u>
0	100
2,5	93
5	88
7,5	81
10	76
100	19,5
témoin (législation sur les margarines)	71

A partir de ces résultats, on établit la courbe exprimant les transmissions en %, par rapport aux concentrations en sésamol en grammes par tonne de beurre.

Suivant cette courbe, une transmission de 71% correspondrait à une dose de l'ordre de 13 gr de sésamol pur contenue dans environ 1/5 de tonne de margarine, soit 65 gr de sésamol pur par tonne de margarine. La dose légale minimum prévue dans la réglementation belge sur les margarines représente donc environ 65% de la dose exigée (règlement CEE n° 1390/69) dans les beurres tracés.

A la dose de 100 gr sésamol/tonne, la coloration est très forte et ne peut pratiquement être lue avec précision suffisante au colorimètre.

A la dose de 2,5 gr de sésamol/tonne de beurre, la coloration est difficilement perceptible à l'oeil. C'est à dire que le test de Villavecchia, effectué suivant la méthode classique, permet, à la limite, la mise en évidence de 2,5% d'un "butter oil" contenant 100 gr de sésamol/tonne dans une matière grasse butyrique ou 5% de butter oil contenant 50 gr de sésamol/tonne.

La méthode ainsi suivie (5 gr de matière grasse + 5 ml HCl d 1,16 + 5 gouttes solution alcoolique à 2% de furfurol) est trop peu sensible pour les besoins de nos recherches.

La coloration obtenue, dans les conditions de l'essai, pour une matière grasse provenant d'un beurre tracé au sésamol à la dose de 100 gr/tonne de beurre pourrait être réalisée en quintuplant les quantités respectives de solutions décimales de permanganate et de bichromate de potassium, soit donc

0,75 ml de KMn O4 N/10

2,5 ml de K2 Cr2 O7 N/10

à porter à 50 ml avec de l'eau distillée (le tout mis en présence de 50 ml de paraffine).

En effet, dans nos conditions de lecture au colorimètre, semblable témoin coloré présente un % de transmission de l'ordre de 18 - 20.

2.2. Test de Villavecchia modifié de façon à accroître sa sensibilité

2.2.1. Description de la méthode

Dans des tubes à essais calibrés de 160 x 16 mm, introduire successivement:

10 ml HCl D^{té} 1,16 et

1 ml de matière grasse tracée;

réchauffer quelques instants au bain-marie à 50°C;

ajouter 5 gouttes de solution alcoolique de furfurol à 2%

agiter et laisser séparer;

procéder d'une manière analogue avec 1 ml de matière grasse pure (témoin);

examiner les colorations obtenues dans le tube même, au colorimètre Lumetron avec filtre de 515 nm, en réglant la transmission à partir du témoin à 100%.

2.2.2. Application du test modifié à la détermination des concentrations en sésamol dans la graisse butyrique

Etablissement d'une courbe d'étalonnage

<u>Concentration en sésamol gr/tonne de</u> <u>beurre</u>	<u>% de transmission</u>
0	100
5	94
10	83
20	68,5
40	39
60	22
80	12
100	6

Cette méthode étant beaucoup plus sensible pour les teneurs inférieures à 40 gr/tonne de beurre, convient mieux pour suivre les essais d'élimination du sésamol, entre autres, ceux basés sur des lavages de la matière grasse tracée.

2.3. Méthode de dosage du sésamol présent dans des eaux de lavage de la matière grasse

(Méthode dérivée de la méthode de Suarez et al. pour la détermination du sésamol libre dans les huiles et les concentrés de sésamine - Analytical Chemistry 24 - 4 - avril 1952 pp 668 - 671).

2.3.1. Description de la méthode

Dans un ballon jaugé de 50 ml, déposer successivement:

50 ml H₂ SO₄ d = 1,37;

2 ml d'eau contenant du sésamol;

1 ml de la solution alcoolique du furfurol à 2%;

boucher, mélanger et laisser développer la coloration pendant

1 heure;

examiner la coloration développée dans une cuvette de 1 cm de large au spectrophotomètre à 518 nm;

exprimer les résultats en % de transmission ou en densité optique en fonction de la teneur en sésamol de l'eau, exprimée en mgr de sésamol par litre d'eau.

Les courbes d'étalonnage ont été établies avec diverses dilutions d'une solution aqueuse de sésamol pur (Naarden Hollande 21310 - Sésamol B 4160) la solution initiale (31,3 mgr de sésamol/litre d'eau) correspond à l'eau de lavage obtenue en lavant (1 p. de mat. gr. par 4 p. d'eau) de la matière grasse tracée au taux réglementaire (100 gr/tonne de beurre), en admettant que la totalité du sésamol contenu dans la mat. gr. soit passée dans la phase aqueuse.

2.4. Réaction de Villavecchia appliquée sur les spots de sésamol séparé par chromatographie en couche mince

Le sésamol en solution aqueuse alcaline ou alcoolique peut être séparé des autres substances extraites par ces solvants, par chromatographie sur couche mince, et révélé par le réactif de Villavecchia.

La méthode de séparation en couche mince a l'avantage d'être exactement la même que celle qui servira à la séparation de la vanilline.

2.4.1. Méthode

Nous avons utilisé des plaques préparées de Kieselgel Merck F 254, de 20 cm de côtés, imprégnées d'une couche de Kieselgel de 0,25 mm d'épaisseur.

Ces plaques sont activées pendant au moins 1 h à 110°C et elles seront saturées de solvant avant de commencer le développement.

Pour ce faire, les plaques à développer sont posées dans les cuves inclinées et couvertes pendant une demi-heure en présence du solvant de développement, sans que la base des plaques baigne dans le solvant.

On commencera le développement après une demi-heure en redressant simplement les cuves.

Le solvant de développement est un mélange benzène-méthanol (97:3).

Dans ces conditions, le rf du sésamol est exactement le même que celui de la vanilline (0,35 à 0,40). Si on extrait simultanément la vanilline et le sésamol d'un beurre, les spots après développement en couche mince sur plaque de Kieselgel renferment donc à la fois de la vanilline et du sésamol. Il faut donc pour mettre en évidence ces deux substances, opérer avec des réactifs assez spécifiques.

Le sulfate d'hydrazine et la benzidine, en milieu HCl, réactifs des aldéhydes, réagissant avec la vanilline (coloration jaune ou orange) mais non avec le sésamol.

Le réactif de Villavecchia est spécifique du sésamol (coloration rouge violacée) et ne réagit pas avec la vanilline.

En conséquence, on peut révéler le sésamol sur la plaque sans qu'il y ait aucune interférence avec la vanilline.

Le développement ordinaire sur 14 cm, par un tel procédé dure environ 1 h 45', après quoi les plaques sont séchées à l'air jusqu'à évaporation du solvant.

Comme le réactif de Villavecchia est spécifique du sésamol, on a cependant intérêt à limiter le développement, pour la détermination de celui-ci à 10 ou même à 5 cm.

Dans ce cas, les spots de sésamol sont moins diffus, la sensibilité du test en est augmentée tout en réalisant un gain de temps appréciable.

On révèle par une solution d'acide chlorhydrique d 1,16, contenant 1% de solution alcoolique à 2% de furfurool. Le révélateur doit être préparé immédiatement avant l'emploi. Les spots de sésamol sont colorés en rouge violacé.

2.4.2. Sensibilité du test de Villavecchia appliqué après séparation du sésamol en couche mince

On a préparé des solutions alcooliques à taux décroissants de sésamol, soit des solutions de 0,01% et 0,005%, correspondant respectivement à

la concentration réglementaire de 100 gr de sésamol/tonne de graisse butyrique et à la concentration rencontrée sur le marché belge de 50 gr de sésamol à la tonne de butter oil tracé.

Des solutions alcooliques à 0,001% et 0,0005% de sésamol ont aussi été préparées.

Le développement des plaques a été limité à 10 cm de façon à éviter la diffusion des spots.

0,030 ml d'une solution à 0,0005% de sésamol dans l'alcool, donne encore un spot facilement décelable après révélation.

Comme nous déposons habituellement 0,100 ml de solution en chromatographie sur couche mince, on peut considérer que 0,100 ml de solution à 0,00017% de sésamol restent facilement décelable par cette méthode.

Une telle limite de sensibilité, rapportée aux concentrations de 100 gr et de 50 gr de sésamol par tonne de graisse, correspond à la mise en évidence respective de 1,7% de butter oil tracé à raison de 100 gr/tonne de graisse et 3,4% de butter oil tracé à raison de 50 gr tonne de graisse, dans une matière grasse butyrique normale, ceci à condition d'extraire tout le sésamol d'un volume de graisse, par un volume équivalent de solvant. Nous verrons au chapitre suivant que c'est pratiquement possible.

3. Techniques d'extraction du sésamol de la matière grasse

Ne connaissant pas les valeurs des coefficients de partage du sésamol entre la matière grasse et les divers solvants, nous les avons recherchés expérimentalement grâce au test de Villavecchia et à la chromatographie sur couche mince.

3.1. Coefficient de partage du sésamol entre la graisse et l'eau

10 à 15% du sésamol d'un butter oil dénaturé ordinaire (100 gr de sésamol/tonne) passent en solution aqueuse, si on mélange des volumes égaux de "butter oil" tracé et d'eau à 50°C. On peut estimer la valeur du coefficient de partage du sésamol entre la graisse et l'eau approximativement à 7.

3.2. Coefficient de partage du sésamol entre la graisse et l'alcool à 95%

Dans les mêmes conditions que ci-dessus, environ 90% du sésamol passe en solution alcoolique. Le coefficient de partage du sésamol entre la graisse et l'alcool est de l'ordre de 1 à 10.

On peut donc extraire 90% du sésamol d'un butter oil tracé ordinaire par

un même volume d'alcool à 95%. Cependant, la séparation des phases grasses et alcooliques est difficile, vu l'intersolubilité partielle de ces phases.

En couche mince, la présence de triglycérides n'affectera pourtant pas le résultat de l'analyse et cette méthode d'extraction peut parfaitement être appliquée pour la mise en évidence du sésamol.

3.3. Extraction du sésamol par une solution de potasse alcoolique

On peut considérer que le sésamol d'un volume de "butter oil" tracé est pratiquement entièrement extrait (95 à 100%) par un volume équivalent de potasse alcoolique N/20. L'extraction est également de l'ordre de 95%, si elle est effectuée par un volume de solution de potasse moitié moindre de celui de la graisse.

La sensibilité du test de mise en évidence du sésamol dans ces solutions alcooliques, alcalinisées dépend évidemment de la concentration du sésamol dans ces solutions, donc de son extractibilité par celles-ci.

Comme cette extractibilité est très grande, on peut extraire un volume de graisse par un minimum de solution alcaline. En pratique, nous nous sommes limités à l'extraction d'un volume de graisse par 1/4 de volume d'alcool, à cause de l'intersolubilité des phases grasses et aqueuses.

Cette technique permet de retrouver la présence de 0,5% de beurre tracé (100 gr/tonne) dans une matière grasse butyrique normale.

Les solutions alcooliques alcalines de sésamol doivent être gardées fraîches et examinées rapidement, la concentration en sésamol (test de Villavecchia) tendant à diminuer lentement avec le temps; on peut cependant les garder quelques jours au frais (+ 5°C).

3.4. Extraction du sésamol par les solutions aqueuses alcalines

3.4.1. Caractère faiblement acide des solutions de sésamol

Le sésamol possédant des propriétés de solubilité dans divers solvants et certaines propriétés chimiques se rapprochant de celles de la vanilline, nous avons procédé pour ces deux composés à des tests semblables en vue de leur élimination.

La vanilline d'une solution aqueuse peut être dosée avec assez de précision grâce à son caractère acide, par de la soude 0,1 N en présence de thymolphthaléine comme indicateur: 1 cc de soude 0,1 N correspond à 15,21 mgr de vanilline (le poids moléculaire de la vanilline étant de 152,1).

Il n'en est pas de même du sésamol dont l'ionisation en solution aqueuse est considérablement moindre.

Si, dans les mêmes conditions, on essaie de doser le sésamol d'une solution aqueuse légèrement alcoolisée, pour solubiliser le sésamol, le virage de l'indicateur se produit lentement et est déjà net pour environ 1/3 de la quantité escomptée pour une ionisation complète, la coloration s'intensifiant toujours d'avantage pour des concentrations de plus en plus grandes en alcalis.

Le caractère légèrement acide du sésamol et son faible degré d'ionisation en solution aqueuse sont à la base des techniques d'extraction totale du sésamol, telle la méthode décrite par Suarez dans un article déjà cité. Suivant cette méthode, on extrait le sésamol libre d'une solution d'huile de sésame, ou de concentré de sésamine dans l'isooctane ou le chloroforme, par l'eau légèrement alcoolisée et alcalinisée par KOH (mixture d'extraction composée de 10 gr KOH, 80 ml d'eau et 20 ml d'alcool éthylique).

3.4.2. Procédé analytique d'extraction du sésamol

On dissout 5 ml de matière grasse tracée dans 50 ml d'un mélange éther-chloroforme (2) et on extrait par 10 ml de mixture alcaline ci-dessus. L'extraction est totale et on ne retrouve plus de traces de sésamol dans la matière grasse traitée.

Toutefois ce procédé analytique d'extraction du sésamol ne pourra être utilisé pratiquement en vue de l'élimination du sésamol d'une matière grasse.

3.4.3. Extraction du sésamol par l'eau ammoniacale

L'extraction du sésamol par l'eau ammoniacale (5cc NH₄ OH concentré/litre) est, contrairement à ce qui se passe pour la vanilline, peu satisfaisante car très incomplète. Alors que des volumes d'eau ammoniacale (NH₄ OH environ N/20) équivalant aux volumes de graisse à extraire, enlèvent la totalité de la vanilline, pour le sésamol, l'extraction n'atteint qu'environ 25% de la dose présente dans les beurres tracés aux taux réglementaire de 100 gr/tonne.

3.4.4. Extraction du sésamol par des solutions aqueuses de Na₂CO₃

50 gr de matière grasse tracée ont été extraits par deux lavages successifs par une solution de carbonate de soude avec un excès d'alcali nécessaire à la neutralisation des acides gras, excès de 50% (une partie de

graisse pour 4 parties de solution).

Après le premier lavage, la teneur en sésamol du beurre tracé est passée de 100 gr à 38 gr/tonne de beurre.

Après le deuxième lavage, elle est descendue à 11 gr/tonne.

Après deux rinçages par 4 parties d'eau pure, elle est tombée à 3 gr/ton.

3.4.5. Extraction du sésamol par des solutions aqueuses diluées de soude

Si on extrait le sésamol d'un volume de matière grasse d'un butter oil tracé, par le même volume de soude 0,01 N, correspondant à un dépassement de 10 à 20% du point de neutralisation des acides gras, une quantité voisine de 50% du sésamol total passe en solution aqueuse.

Si la concentration de la solution alcaline est doublée (NaOH 0, 02N), environ 80% du sésamol passe en solution aqueuse.

Enfin, l'extraction du sésamol d'un volume de beurre tracé est pratiquement complète (supérieure à 95%), si on l'effectue par un volume équivalent de Na OH 0, 05 N.

Les solutions aqueuses alcalines de sésamol ne maintiennent pas leurs concentrations en sésamol. Au bout de quelques jours, la disparition de celui-ci (réactivité au test de Villavecchia appliqué en couche mince) est très importante.

Dans un but analytique, il est donc possible d'extraire le sésamol par des solutions d'alcalis forts; cependant, la détermination de celui-ci doit être effectuée rapidement, en tout cas, endéans les 24 heures si on veut obtenir un test très sensible et suffisamment précis.

4. Elimination du sésamol de la matière grasse butyrique

4.1. Elimination du sésamol par les solvants

Une élimination industrielle du sésamol des graisses par des solvants ne peut être conçue à partir de lavages à l'eau (élimination trop faible) ou à l'alcool (coûteux).

L'eau ammoniacale ou légèrement alcalinisée (excès d'alcalis nécessaires à la neutralisation des acides gras inférieur à 50%) ne peut également être utilisée car l'élimination est trop partielle et nécessiterait un nombre très important de lavages.

A partir d'un excès de 50% de la quantité d'alcalis nécessaires à la neutralisation des acides gras, l'élimination du sésamol peut devenir intéressante.

4.1.1. Elimination du sésamol par des solutions diluées de Na₂CO₃

Les essais en laboratoire sont repris au chapitre 2.4.4.

Au stade semi-industriel, nous avons cependant constaté que les taux d'élimination étaient considérablement moindres que ceux obtenus en laboratoire; nous ne connaissons cependant pas les raisons exactes de ce phénomène.

Plus les quantités de matières grasses traitées sont importantes, plus il semble difficile d'éliminer le sésamol par lavage.

4.1.2. Elimination du sésamol par des solutions diluées de soude

Les solutions d'alcalis forts doivent nécessairement apporter une quantité de base très supérieure à celle nécessaire pour atteindre le point de neutralisation des acides gras, si on désire enlever des taux appréciables de sésamol sans lavages excessifs. Cependant, dès que l'on dépasse le point de neutralisation des acides libres d'une graisse, avec un alcali fort, surtout à chaud, puisqu'il faut nécessairement opérer au delà du point de fusion des glycérides, on provoque une saponification importante, saponification qui est à l'origine de pertes plus ou moins importantes de matières grasses et qui risque toujours d'abaisser nettement la valeur marchande du produit traité si l'élimination des savons n'est pas complète. Au laboratoire (centrifugation à moins de 1000 tours/minute) et même au stade semi-industriel, cette élimination ne sera pas complète et la qualité de la matière grasse est altérée.

Dans des essais de traitements à échelle semi-industrielle avec des solutions de carbonate de soude (1,5 x A.M.G.), dans le rapport 1 partie de graisse pour 4 parties de solution de soude, et récupération centrifuge de la matière grasse, nous avons constaté que les taux d'élimination ont tendance à diminuer par rapport aux essais de laboratoire: alors que dans ces derniers on arrivait à des éliminations de l'ordre de 92 - 92,5%, dans les traitements semi-industriels nous n'atteignons plus que 76 à 86%. Nous ne nous expliquons pas la raison de cette différence.

Cependant, au stade industriel, le raffinage alcalin de nombreuses huiles alimentaires est ordinairement conduit par des solutions de soude ou d'alcalis forts, allant jusqu'à un excès de 100% et même davantage de la quantité strictement nécessaire pour neutraliser les acides gras libres. Les savons sont éliminés par centrifugation à une vitesse très élevée et la graisse filtrée à chaud sous pression sur des filtres spéciaux.

On obtient ainsi des graisses neutres de bonne qualité.

Ces techniques relèvent évidemment de l'huilerie et de la margarinerie et demandent donc un matériel assez coûteux et des techniques spécialisées.

Elles ne sont sans doute pas utilisables par des "retravailleurs" aux moyens modestes, ni probablement par des laiteries qui n'ont pas l'utilisation pratique de ce matériel.

Elles pourraient éventuellement être utilisées par des "retravailleurs" en "gros" qui auraient tôt fait d'amortir le matériel coûteux indispensable par les bénéfices plantureux qu'ils pourraient réaliser en récupérant comme beurre ordinaire, le beurre tracé dont le sésamol aurait été éliminé. Le raffinage alcalin est cependant une technique très spéciale assez longue et susceptible d'être mal appliquée, et donc de ne pas donner les résultats escomptés (la sensibilité du test de Villavecchia est extrêmement grande). Nous doutons qu'il puisse être appliqué à la graisse butyrique à des fins de fraude, vu les investissements qu'il réclame et les résultats aléatoires qu'il pourrait donner.

Nous retiendrons essentiellement de ce chapitre qu'on peut éliminer facilement d'une manière économique et par simple lavage par des solutions diluées d'alcalis, au moins 75% du sésamol présent dans une graisse butyrique. Une telle opération est réalisable avec le matériel dont disposent les laiteries ou tous les "retravailleurs" de beurre (cuves, centrifugeuses, solutions alcalines etc...) et peut être effectuée très rapidement (minimum 1 h), si les traitements peuvent se suivre comme un travail à la chaîne. La graisse lavée est commercialement utilisable. Une élimination plus poussée est plus difficile, mais certainement possible au stade industriel.

4.2. Elimination du sésamol par l'action de la température à pression atmosphérique

Des tests identiques ont été réalisés pour le sésamol et la vanilline, ces deux composés ayant des constantes physiques (point de fusion et d'ébullition) du même ordre de grandeur.

Le sésamol "Stanlex" fond à 64°30 et bout vers 264 - 266°C, tandis que la vanilline utilisée fond à 82°30 et bout vers 284°C.

Le sésamol est donc légèrement plus volatil que la vanilline.

4.2.1. Essais

Des échantillons de "butter oil" commercial contenant 200 gr de vanilline et 100 gr de sésamol/tonne de graisse ont été placés à l'étuve à 110-115°C pendant 24, 48, 72 et 96 h.

Dans un premier lot, 20 gr de butter oil tracé ont été placés dans un vase de berlin de 100 cc (épaisseur de la couche de matière grasse: 1,4 cm).

Dans un deuxième lot, 20 gr de butter oil tracé ont été placés dans des tubes en verre de 40 cc ouverts (épaisseur de la couche de matière grasse: 7 cm).

Dans un troisième lot, 20 gr de butter oil tracé ont été placés dans les mêmes tubes en verre fermés par un bouchon rodé.

En outre, un échantillon de 250 gr de butter oil tracé par 100 gr de sésamol à la tonne, a été placé à l'étuve à 170°C pendant plusieurs heures. La disparition graduelle du sésamol a été examinée par le test de Villavecchia appliqué sur les plaques de chromatographie en couche mince.

4.2.2. Résultats

a) Echantillons chauffés 24 h à 110 - 115°C

- 1er lot: diminution importante du sésamol (environ 50%)
- 2e lot: diminution plus légère du sésamol (70% du taux initial subsistent)
- 3e lot: diminution fort légère du sésamol (85% du taux initial subsistent).

b) Echantillons chauffés 48 h à 110 - 115°C

- 1er lot: diminution importante du taux de sésamol (10% du taux initial subsistent)
- 2e lot: diminution plus légère du taux de sésamol (60 à 70% du taux initial subsistent)
- 3e lot: diminution légère du taux de sésamol (70 à 80% du taux initial subsistent).

c) Echantillons chauffés trois jours à 110 - 115°C

- 1er lot: disparition totale du sésamol de la matière grasse
- 2e lot: diminution importante du taux de sésamol (50% du taux initial subsistent)
- 3e lot: diminution plus légère du taux de sésamol (70% du taux initial subsistent).

d) Echantillons chauffés quatre jours à 110 - 115°C

2e lot: diminution importante du taux de sésamol (30 à 40% du taux initial subsistent)

3e lot: diminution plus légère du taux de sésamol (50% du taux initial subsistent)

e) Echantillon chauffé à l'étuve ordinaire à 170°C pendant plusieurs heures

Durée du chauffage: 0h 1h 1h30 2h30 3h30 4h30 5h30

Teneurs en sésamol gr/tonne de graisse *	100	100	100	98	89	78	65
--	-----	-----	-----	----	----	----	----

* Ces dernières teneurs ont été appréciées en spectrophotométrie au moyen d'une courbe d'étalonnage (méthode décrite en 2.2.1.).

Ces résultats sont à comparer à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec la vanilline. Ils font ressortir la volatilité du sésamol.

Celle-ci est même légèrement supérieure à celle de la vanilline.

Evidemment, les échantillons chauffés dans de telles conditions sont commercialement irrécupérables, ceci étant dû non tant à la température élevée, mais plutôt à l'oxydation de la matière grasse.

4.3. Elimination du sésamol par jets de vapeur à haute température (200°C sous vide poussé (5 mm) - Désodorisation

Ce procédé est connu en huilerie sous le nom de "stripping".

Si à pression ordinaire, le sésamol possède un point d'ébullition d'environ 265°C, à pression réduite, le point d'ébullition est beaucoup moins élevé. Nous n'avons pas trouvé de données dans la littérature à ce sujet.

Cependant, nous en possédons pour la vanilline dont la volatilité est du même ordre que celle du sésamol et lui est même légèrement inférieure.

Dans le tableau ci-dessous, nous donnons pour comparaison, les points de fusion et d'ébullition de la vanilline et du sésamol.

	Vanilline	Sésamol
P.F.	80 - 82°C	64°C
P.E. 760 mm	285°C	265°C
P.E. 6 mm	140 - 145°C	-

Suite à l'examen de ce tableau on peut tenir pour assuré que sous 5 mm de pression (pression courante en stripping) le sésamol aura un point d'ébullition de 130 à 140°C.

Le stripping s'effectue généralement à des températures de 200°C pouvant même aller jusqu'à 250°C (3). Il enlève de 0,2 à 0,8% du matériel traité, dont la proportion la plus notable est constituée par des acides gras libres soit environ 70 à 85% des acides libres totaux pour une matière grasse ayant une acidité de l'ordre de 0,1%.

Dans les matières grasses traitées, il reste cependant toujours une acidité libre de l'ordre de 0,015 à 0,03% car pour un tel seuil, il se forme par hydrolyse pratiquement autant d'acides libres que le "stripping" en enlève. Actuellement, la désodorisation commerciale est pratiquée dans de telles conditions que les pertes totales sous forme d'acides gras libres ne sont pas supérieures à 20 ou 40% des pertes totales.

La température, la pression et le débit de vapeur à l'heure sont étroitement liés dans les techniques de désodorisation par "stripping".

La durée de l'opération dépend évidemment des résultats que l'on veut obtenir (élimination plus ou moins complète des acides gras libres). Elle est habituellement voisine de 2 h.

En accroissant les températures de désodorisation de 177°C à 204°C, on multiplie approximativement la quantité de substances volatiles extraites par 3.

La quantité de vapeur injectée doit être calculée pour éviter un entraînement trop important d'huile neutre.

Dans un désodorisateur industriel de 10.000 l, on peut traiter à 200° la matière grasse chauffée par un débit de vapeur d'environ 175 kg/heure à une pression de 10 mm, ce qui correspond à un débit environ moitié moindre pour une pression de 5 à 6 mm.

La désodorisation effectuée correctement élimine pratiquement complètement les substances volatiles des matières grasses, donc le sésamol et la vanilline.

Elle détruit les peroxydes et élimine les aldéhydes ou tout produit volatil pouvant être produit par oxydation à l'air. Les produits fortement oxydés ou rances ne peuvent cependant être complètement désodorisés, car ils perdent au cours de l'oxydation une part importante de leur stabilité naturelle. Au contraire, les graisses ou huiles de bonne qualité voient leur stabilité accrue par désodorisation.

La stabilité des graisses animales après désodorisation est cependant moindre que celle des graisses ou huiles végétales, à cause de la carence naturelle de ces graisses en antioxydants.

(3) Bailey's industrial Oil and Fat Products 3d Ed. 18 Deodorization p. 897

On peut donc être certain que le sésamol et la vanilline peuvent être éliminés par désodorisation (stripping) de la matière grasse, sans être obligé de recourir à des conditions très sévères de température et de pression. Les conditions exigées sont au contraire techniquement faciles à réaliser et tout à fait courantes en huilerie.

L'élimination du sésamol comme de la vanilline par "stripping" à 200°C et 6 mm de pression est une opération simple rapide efficace et relativement peu coûteuse; même en tenant compte de l'investissement de base nécessaire à l'accomplissement de ce travail.

Nos premiers essais de "stripping" au laboratoire, dans des conditions de pression moins sévères que celles réalisées dans l'industrie, à une température de 190 - 195°C confirment que l'on peut obtenir une graisse de beurre de bonne qualité après l'application d'un tel traitement.

Nous avons réussi à enlever plus de 99% de sésamol (test de Villavecchia négatif) par "stripping" au laboratoire dans les conditions suivantes:

Volume de graisse traitée: 300 ml

Température: 190°C

Pression: 1 mm Hg

Eau chaude injectée: env. 5% (15 ml)

Durée du traitement: 1 h

Les techniques industrielles de "stripping" étant encore davantage élaborées que notre technique de laboratoire, l'élimination du sésamol de la graisse butyrique par "stripping" est commercialement et économiquement possible au stade industriel.

5. Substitution du sésamol par l'huile de sésame

L'huile de sésame naturelle contient un pourcentage variable de sésamol libre ou lié (0,14 à 0,82%). Le sésamol libre disparaît assez rapidement dans les huiles raffinées, de sorte que celles-ci sont beaucoup moins réactionnelles au test de Villavecchia pratiqué dans les conditions ordinaires. Le sésamol libre est extrait à l'alcool ou par des solutions alcooliques ou aqueuses très alcalinisées, mais non la sésamoline (sésamol lié).

Si le sésamol libre est éliminé de l'huile de sésame, le test de Villavecchia ordinaire hydrolysant la molécule de sésamoline pour libérer le sésamol, reste positif.

Au contraire, une extraction par l'alcool ou par des solutions alcooliques légèrement alcalinisées, n'entraînant pas la sésamoline, mais uniquement

le sésamol libre, le test appliqué sur l'extrait en chromatographie sur couche mince sera négatif.

Nous avons constaté l'exactitude de cette hypothèse sur des échantillons de "butter oil" comportant 3% d'huile de sésame.

Ces échantillons avaient été conservés pendant deux mois à la température d'environ 5°C, mais de telles conditions n'ont pas pu éliminer le sésamol libre.

La réponse au test classique de Villavecchia en tube de verre, après hydrolyse acide, était nettement positive, tandis que la réponse au test effectué sur l'extrait alcoolique alcalinisé était tout à fait négative, même à des concentrations quadruples de celles ordinairement utilisées.

La disparition effective du sésamol libre dans les huiles de sésame raffinées est une indication supplémentaire des possibilités d'élimination du sésamol des matières grasses par certains traitements industriels.

La mise en évidence d'huile de sésame dans la matière grasse de beurre en place de sésamol pur, peut donc être effectuée conjointement par la réalisation du test classique de Villavecchia et de sa variante en couche mince, mais aussi évidemment par l'analyse des stérols, (présence de phytostérols) et même éventuellement par l'analyse des acides gras (taux d'acide linoléique).

N.B. A condition d'être commercialement disponible à un prix économique, la sésamoline n'étant pas extraite des graisses par lavage ou par "stripping", serait probablement un meilleur traceur que le sésamol.

II. LA VANILLINE

1. Définition et propriétés générales de la vanilline

La vanilline est un composé à fonctions aldéhyde et phénol naturellement présent dans les gousses de vanille. C'est le 4 hydroxy 3 méthoxy benzaldéhyde $C_6H_3OCH_3OHCOH$. Son point de fusion est voisin de $81^{\circ}C$ et son point d'ébullition de $285^{\circ}C$. Une partie de vanilline est soluble dans 1,5 partie d'alcool éthylique, 8 parties d'éther, 3 parties de chloroforme et environ 100 parties d'eau à température ordinaire.

La vanilline possède un caractère acide marqué qui permet de la doser à l'état pur en solution aqueuse, par une solution de soude en présence de thymolphthaléine comme indicateur.

1 ml de soude 0,1 N correspond en effet à 15,22 (P.M./10) mgr de vanilline. Elle est donc soluble dans les solutions basiques.

La vanilline naturelle des extraits de vanille est accompagnée d'autres substances aromatiques qui confèrent à ces extraits leur spécificité et leur valeur.

La vanilline peut être également préparée par synthèse à partir de l'eugénol extrait de l'essence de girofle ou du gaiacol extrait du goudron de hêtre.

La vanilline utilisée pour nos essais est une vanilline de synthèse 99-100% pure produite par les Etablissements Coene.

1.1. Contrôle de la pureté des cristaux de vanilline

Nous avons contrôlé la pureté de la vanilline Coene par divers tests physiques et chimiques. Les résultats de ce contrôle sont les suivants:

	<u>Littérature</u>	<u>Vanilline "Coene"</u>
P.F.	80 - $82^{\circ}C$	$82^{\circ}3C$
P.E.	$285^{\circ}C$	283 - $285^{\circ}C$
Dosage par Na OH 0,1 N	-	99,1 à 101,3%

Par chromatographie gazeuse et par chromatographie sur couche mince nous n'avons pu mettre en évidence d'autres aldéhydes que la vanilline. En conséquence, on peut considérer qu'il existe sur le marché des vanillines de synthèse pratiquement pures à 100%.

2. Test organoleptique de la vanilline dans les beurres

Par son odeur caractéristique, la vanilline, pour autant qu'on atteigne certaines concentrations, a le grand avantage de pouvoir être perçue organoleptiquement dans les beurres. Toute sensation organoleptique est évidemment subjective et se manifeste à des degrés divers selon les individus; cependant la perception d'une odeur de vanille s'impose naturellement et elle engage celui qui l'a perçue à confirmer son impression par un test plus précis. Nous avons voulu connaître approximativement le seuil de perception de l'odeur de vanille dans la matière grasse butyrique.

2.1. Expertises organoleptiques

Deux séries d'expertises organoleptiques ont été organisées. Des "butter oils" de beurres normaux et des "butter oils" de beurre vanillinés ont été examinés. On a réalisé des mélanges suivant des teneurs croissantes de "butter oil" normal et de "butter oil" vanilliné à raison de 200 gr/tonne.

Une première série comprenait 24 "butter oils" dont la teneur en beurre vanilliné ordinaire (200 gr/tonne de graisse) allait de 0 à 100%.

Les teneurs suivantes avaient été réalisées: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100% de "butter oil" vanilliné ordinaire dans de la graisse de beurre normale.

Chaque échantillon avait été préparé en double.

Les 24 échantillons ont été maintenus 8 jours entiers à 13°C dans des flacons ouverts. Ils ont été examinés par une série de sept experts choisis parmi les membres de notre laboratoire habitués à goûter les beurres. Il était demandé aux experts de déterminer la présence en faible, moyenne ou grande quantité, ou l'absence de vanilline dans ces échantillons, uniquement suivant l'ôme. Les échantillons avaient été disposés au hasard. Un "butter oil" sans vanilline et un "butter oil" contenant 200 gr de vanilline à la tonne ont été proposés comme témoins.

Résultats:

14 avis ont été recueillis pour chaque teneur différente en beurre vanilliné.

a) Beurres normaux

14 avis où la présence de vanilline n'est pas ressentie.

b) Beurres contenant 5% de b. o. vanilliné

11 avis où la présence de vanilline n'est pas ressentie.

3 avis où l'expert hésite sur la présence éventuelle de vanilline.

c) Beurres contenant 10% de b. o. vanilliné

5 avis où la présence de vanilline n'est pas ressentie.

2 avis où l'expert hésite sur la présence éventuelle de vanilline.

7 avis où la présence de vanilline est faiblement ou moyennement ressentie.

d) Beurres contenant 20% de b. o. vanilliné

6 avis où la présence de vanilline n'est pas ressentie.

8 avis où la présence de vanilline est faiblement ou moyennement ressentie.

e) Beurres contenant 30% de b. o. vanilliné

12 avis où la présence de vanilline est faiblement ou moyennement ressentie.

2 avis où la présence de vanilline est fortement ressentie.

A partir d'une concentration de 30% de b. o. vanilliné tous les échantillons ont été déclarés posséder une odeur de vanilline à des degrés divers, le degré de perception de l'odeur s'élevant naturellement graduellement avec la concentration en "butter oil" vanilliné.

On peut donc considérer que le seuil de perception de l'odeur de vanilline est atteint dès que la concentration en beurre vanilliné dépasse 20 ou 25% du total de la matière grasse.

Une deuxième série d'expertises a été effectuée pour tenter de confirmer ces résultats.

On a préparé en triple exemplaire des échantillons contenant 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100% de butter oil vanilliné ordinaire (200 gr de vanilline/tonne) dans de la graisse butyrique normale.

Les 21 échantillons conservés à 13°C pendant 8 jours en erlenmeyers de 100 cc fermés, ont été soumis à sept experts, après avoir été ouverts, dans les mêmes conditions que lors de la première série.

Résultats:

21 avis ont été recueillis pour chaque teneur différentes ou beurre vanilliné.

a) Beurres normaux

19 avis où la présence de vanilline n'est pas ressentie.

2 avis où l'expert hésite sur la présence d'une odeur éventuelle de vanilline.

b) Beurres contenant 10% de b. o. vanilliné

6 avis où l'odeur de vanilline n'est pas ressentie.

15 avis où l'odeur de vanilline est faiblement ou moyennement ressentie.

c) Beurres contenant 20% de b. o. vanilliné

3 avis où l'odeur de vanilline n'est pas ressentie.

16 avis où l'odeur de vanilline est faiblement ou moyennement ressentie.

2 avis où l'odeur de vanilline est fortement ressentie.

d) Beurres contenant 30% de b. o. vanilliné

1 avis où l'odeur de vanilline n'est pas ressentie.

14 avis où l'odeur de vanilline est faiblement ou moyennement ressentie.

6 avis où l'odeur de vanilline est fortement ressentie.

Au delà d'une concentration de 30% de b. o. vanilliné, tous les échantillons ont été déclarés posséder une odeur de vanilline à des degrés divers et croissants suivant la concentration.

Les résultats de cette série de tests organoleptiques confirment donc bien ceux de la première série. On peut s'attendre à ce que la perception de l'odeur de vanilline dans une matière grasse soit clairement ressentie pour une concentration en vanilline de l'ordre de 40 à 60 gr/tonne de graisse butyrique, une telle concentration pouvant être réalisée à partir d'un mélange contenant environ 25% de beurre vanilliné commercial (200 gr/tonne) dans un beurre normal.

3. Techniques de détermination de la vanilline d'une matière grasse

Des méthodes officielles de détermination de la vanilline dans les extraits de vanille ont été mises au point et sont reprises dans les "Official methods of analysis of the A.O.A.C.". Les méthodes sont basées sur les propriétés aldéhyde ou phénol de la vanilline et le dosage est effectué par spectrophotométrie en disposant d'une courbe standard.

Ces méthodes donnent souvent des résultats peu concordants et elles sont souvent assez longues (4). Elles sont très difficilement applicables à la matière grasse butyrique et en tout cas, ne peuvent servir de base à l'exécution d'un test rapide.

Par contre, J. Fitelson donne une méthode rapide de détermination de la vanilline par colorimétrie (5). Nous avons appliqué le test de Fitelson légèrement modifié pour déterminer la vanilline dans les eaux de lavage.

Un test rapide de mise en évidence de la vanilline dans les beurres dénaturés a été préconisé par le laboratoire d'Industrie laitière de Douai (6).

Enfin la vanilline peut être isolée par des techniques chromatographiques, telles la chromatographie gazeuse et la chromatographie sur couche mince (7). Nous avons expérimenté principalement trois techniques de détermination ou de mise en évidence de la vanilline dans du beurre.

3.1. Test rapide à la 2-4 dinitrophénylhydrazine (6)

La vanilline d'un volume de graisse est extraite par agitation à chaud avec un volume équivalent d'alcool éthylique à 96°. On centrifuge et on reprend quelques ml de phase alcoolique, laquelle contient pratiquement toute la vanilline du beurre.

On fait réagir sur 3 à 5 ml de solution alcoolique, quelques gouttes de 2 - 4 dinitrophénylhydrazine à 0,4% dans l'acide chlorhydrique 2 N. Si le beurre contient de la vanilline, une coloration rouge - orange vif apparaît.

Cette méthode permettrait, en comparaison avec un témoin, de déceler des mélanges à 5% de beurre marqué à 200 p.p.m. de vanilline dans un beurre pur.

4. D.M. Smith, Comparaison of Methods for the Determination of Vanillin in vanilla Extract. J. A. O. A. C. 48 - 3 - p. 529 - 1965
5. J. Fitelson, Rapid colorimetric method for determining Vanillin 1965 - J. A. O. A. C. p. 913
6. F.M. Luquet et al: Mise en évidence de la vanilline de synthèse dans les beurres dénaturés 1969 Rev. laitière fr. 270, p. 739
7. G. Bonnet, Séparation chromat. en phase gazeuse et sur couche mince de quelques composés à saveur vanillée 1968 Ann. fals. Exp. chim. p. 360.

C'est un bon test de la présence de vanilline dans les graisses.

Notons cependant que la 2 - 4 dinitrophénylhydrazine, réagissant avec les aldéhydes et les cétones, en milieu HCl, n'est pas un réactif spécifique de la vanilline et peut déterminer n'importe quel produit de substitution pourvu qu'il ait un caractère aldéhydrique ou cétonique.

Un dosage colorimétrique par une telle méthode est pratiquement impossible; les solutions alcooliques dissolvent une partie des triglycérides et elles présentent un aspect jaunâtre.

3.2. Méthode colorimétrique de Fitelson (réaction à l'indol) appliquée au dosage de la vanilline dans les eaux de lavage

Mode opératoire

Dans un tube à essais, introduire successivement

1 ml de solution aqueuse contenant la vanilline à doser,

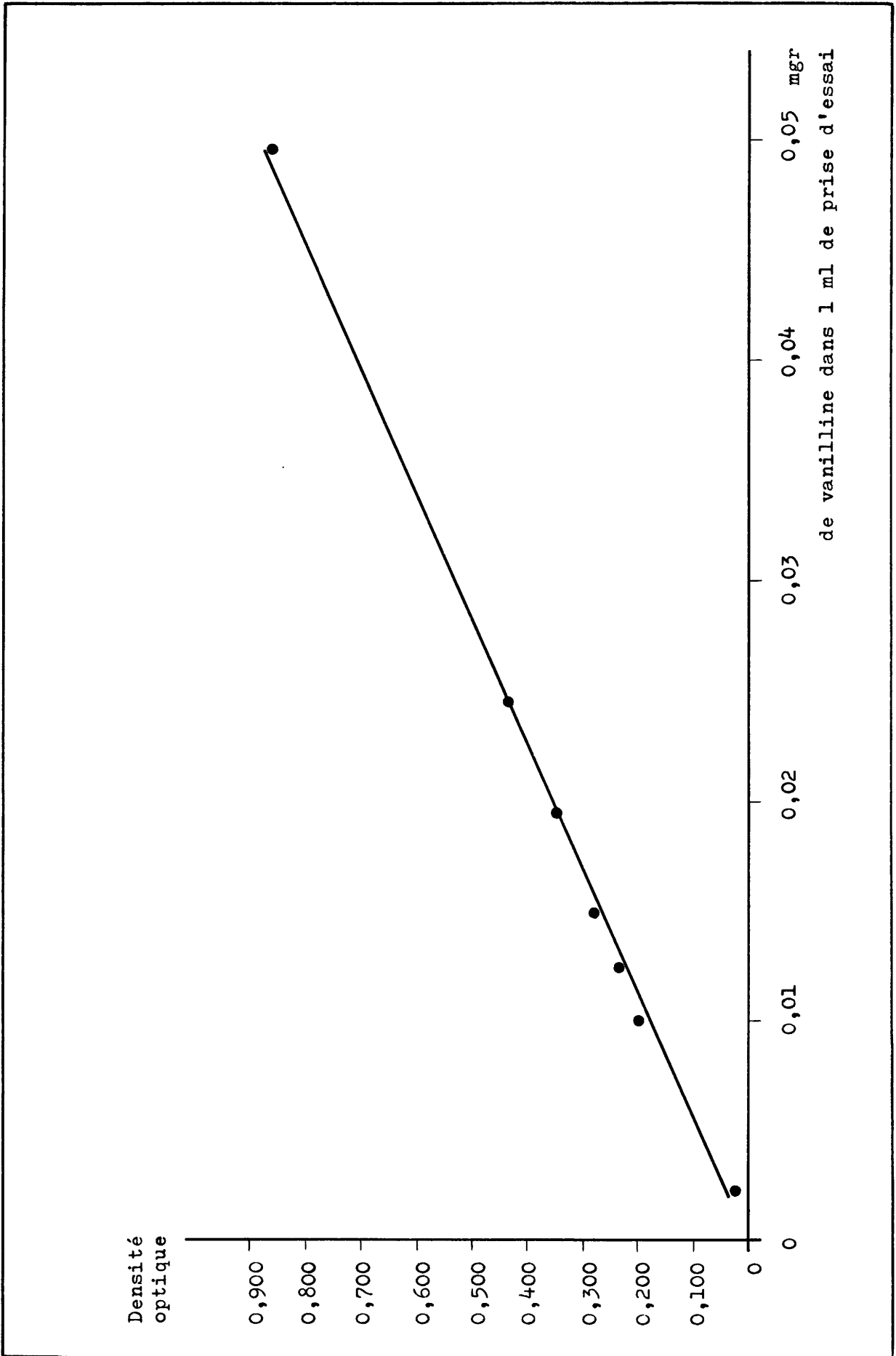
10 ml H₂ SO₄ obtenu en diluant une partie d'acide concentré par une partie d'eau,

2 ml de solution alcoolique d'indol obtenue de la façon suivante: on dissout 0,1 gr d'indol dans 10 ml d'alcool éthylique puis on porte à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée.

Agiter pendant 15 secondes. Laisser la coloration se développer pendant 5 à 10 minutes.

Examiner la coloration au spectrophotomètre dans une cellule de 1 cm à 500 nm.

Etablir une courbe étalon à partir de solutions aqueuses de vanilline de concentration connues.



3.3. Détermination de la vanilline par chromatographie sur couche mince

3.3.1. Méthode

La vanilline d'une matière grasse, extraite par l'alcool ou une solution aqueuse légèrement alcaline (5 cc NH₄ OH concentré par litre) peut être séparée et identifiée en chromatographie sur couche mince, suivant une technique très simple (7).

Le matériel et les solvants utilisés sont identiques à ceux employés pour la séparation du sésamol, soit des plaques de Kieselgel Merck F 254 de 0,25 mm d'épaisseur et un mélange benzène - méthanol (97-3).

La technique de développement est également identique.

Les spots de vanilline sont révélés soit:

- a) par pulvérisation d'une solution saturée de sulfate d'hydrazine dans l'acide chlorhydrique (spots colorés en jaune), ou
- b) par pulvérisation d'une solution de benzidine (4 g de benzidine, 10 ml HCl d = 1,19, eau q. s. 500 cc): les spots sont colorés en orangé.

Le temps de rétention de la vanilline est de l'ordre de 0,35 à 0,40 comme pour le sésamol.

3.3.2. Sensibilité de la méthode

Des solutions contenant 0,02% (concentration de la vanilline dans le "butter oil" vanilliné) 0,001% et 0,0001% de vanilline dans l'alcool à 95° ont été préparées.

On a pu déceler aisément la présence de vanilline après dépôt sur plaque de Kieselgel, développement sur 10 cm et révélation à la benzidine de 0,1 ml de solution à 0,0001%, soit une solution où la concentration en vanilline est 200 fois inférieure à celle d'un beurre vanilliné ordinaire.

Si on extrait 10 gr de beurre vanilliné par 10 cc de solution aqueuse alcaline ^{et si la vanilline passe entièrement en solution aqueuse} on pourra déceler 0,5% de beurre vanilliné ordinaire dans de la matière grasse butyrique normale.

3.3.3. Extraction de la vanilline d'une matière grasse dans un but analytique

Nous avons pu mettre en évidence, par une comparaison des intensités colorées des spots avec ceux obtenus par des solutions standards, que la

vanilline est pratiquement extraite totalement si on opère de la façon suivante:

Déposer dans un tube de 40 cc, 20 ml de butter oil vanilliné contenant 0,02% de vanilline. Ajouter 10 ml d'ammoniaque approximativement N/20. Agiter doucement, afin d'éviter la formation de savons, pendant 15 à 20 secondes (10 retournements du tube). Centrifuger 3 à 5 minutes à 800 tours/minute.

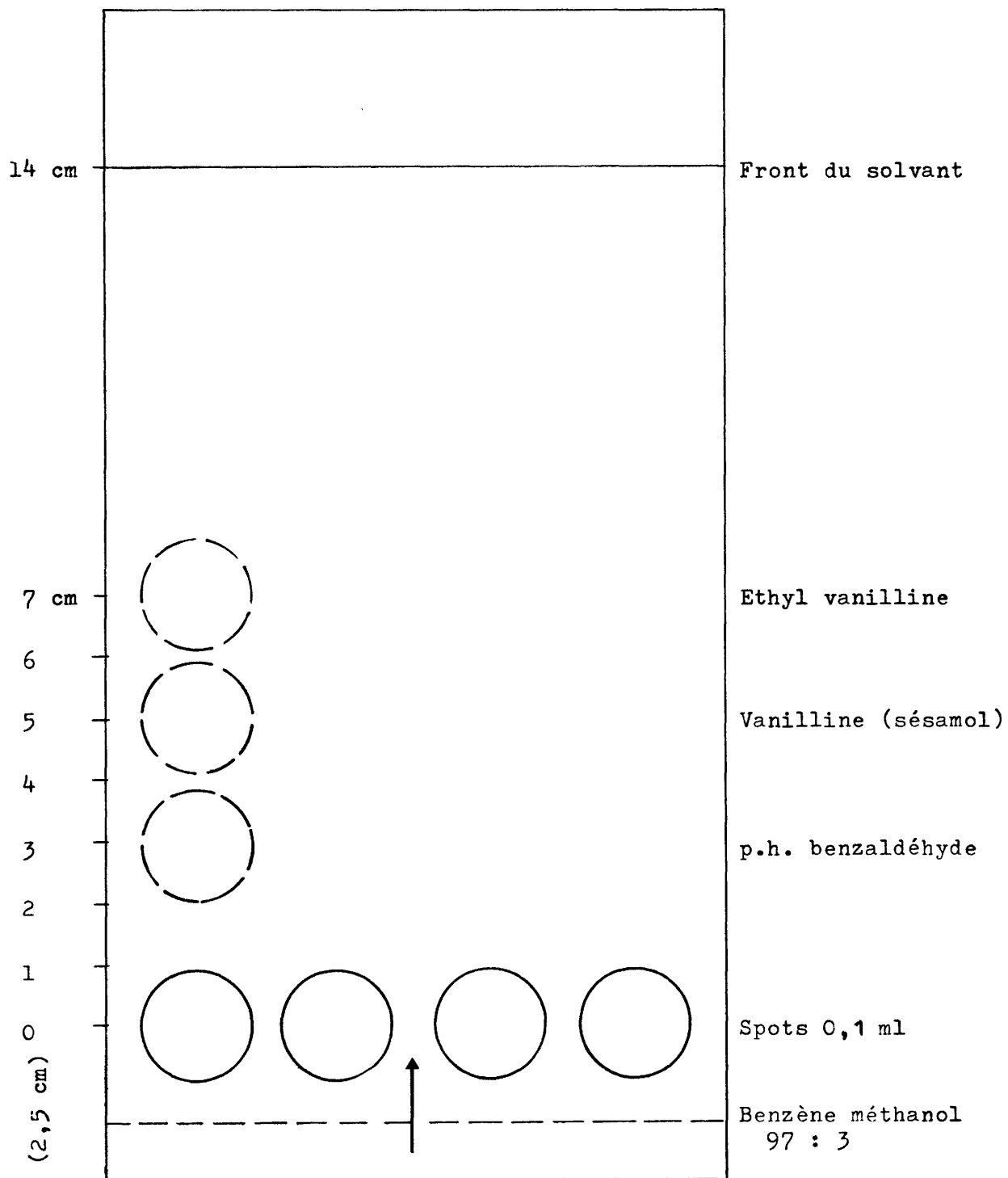
Prélever la matière grasse surnageante en ne laissant qu'un anneau à l'interphase. Solidifier cet anneau à une température inférieure à 6°C, le percer avec un agitateur et filtrer la solution aqueuse sur un filtre plissé. Cette solution est légèrement trouble et prend au bout d'un certain temps une teinte légèrement violacée.

Si on extrait 20 gr de "butter oil" vanilliné ordinaire par 5 ml d'eau ammoniacale (NH₄ OH sensiblement N/20), l'extraction dépasse encore 90%. On voit donc que non seulement 0,5% de beurre vanilliné (200 gr/tonne) dans un beurre normal pourra être décelé par le test de chromatographie sur couche mince, mais bien davantage, puisque l'extraction est presque totale si le volume du solvant d'extraction ne représente que 1/4 du volume de la matière grasse extraite. Il suffirait d'ailleurs pour obtenir une extraction plus complète d'augmenter la concentration en ammoniaque. Une méthode très simple de mise en évidence de la vanilline sous forme de traces peut donc être utilisée. Cette méthode est facile, rapide, peu coûteuse et ne demande qu'un investissement en matériel très réduit. Cette méthode est quasi identique à celle utilisée pour le sésamol. On peut d'ailleurs extraire 95% de la vanilline d'une matière grasse, par l'alcool éthylique, ou la totalité de la vanilline par une solution de potasse alcoolique.

Dans ce cas, l'extraction est semblable à celle utilisée pour le sésamol. Dans la réalisation du test, seul le révélateur final est différent. Le plus couramment, on peut d'ailleurs révéler sur la même plaque, d'abord le sésamol par le réactif de Villavecchia et ensuite la vanilline par la benzidine acide. Ce procédé n'a cependant qu'une valeur de test, la concentration en vanilline ne pouvant être correctement estimée, si la coloration due à la réaction de Villavecchia sur le sésamol est assez intense.

3.3. Détermination de la vanilline par chromatographie en couche mince

3.3.4. Sélectivité de la méthode



3.3.4. Sélectivité de la méthode de détermination de la vanilline par le test à la benzidine appliqué en chromatographie sur couche mince

Les méthodes usuelles de détermination de la vanilline, basées sur la révélation d'un caractère aldéhydique (2 - 4 d. n. p. h., T.B.A., hydrazine, benzidine etc...) ou d'un caractère phénolique (réactif de Folin - Denis) ne sont pas sélectives.

Tous les aldéhydes comme tous les phénols réagiront à leurs tests spécifiques et donneront une réaction de coloration pouvant s'apparenter à celle produite avec la vanilline.

Ainsi, l'éthylvanilline et le parahydroxybenzaldéhyde réagissent avec la benzidine dans les mêmes conditions qu'avec la vanilline.

Cependant la séparation en chromatographie de ces substances est basée sur des propriétés physiques (principalement, un coefficient de partage). L'éthylvanilline et le parahydroxybenzaldéhyde ont des r_f différents de celui de la vanilline, soit environ 0,5 pour l'éthylvanilline et 0,20 pour le parahydroxybenzaldéhyde.

La méthode de détermination de la vanilline par le test à la benzidine (ou au sulfate d'hydrazine) appliqué en chromatographie sur couche mince est donc hautement sélective.

4. Extraction de la vanilline par des solutions aqueuses et alcooliques neutres ou alcalinisées

4.1. Extraction de la vanilline d'une matière grasse par l'eau chaude

Si on extrait un volume de "butter oil" vanilliné par un volume équivalent d'eau chaude (50 - 60°C), l'eau extrait environ 30% de la vanilline, 70% restant dans la phase grasse. Le coefficient de partage graisse/eau est voisin de 2,3.

4.2. Extraction de la vanilline d'une matière grasse par l'alcool à 95% ou une solution de potasse alcoolique

Si on extrait un volume de "butter oil" vanilliné par un volume équivalent d'alcool, plus de 95% de la vanilline passe en solution alcoolique. Pratiquement, on peut donc rechercher la présence de vanilline dans une graisse en l'extrayant par l'alcool éthylique en place d'une solution aqueuse ammoniacale.

L'extraction sera totale par alcalinisation légère de la solution

alcoolique (une partie de potasse alcoolique N/50 pour une partie de graisse). Cette extractibilité de la vanilline par l'alcool n'a qu'un intérêt analytique, vu la difficulté de séparer complètement les phases grasses même après chromatographie sur couche mince, si les concentrations en vanilline sont très faibles.

4.3. Extraction de la vanilline d'une matière grasse par des solutions aqueuses alcalines

4.3.1. Extraction par les solutions aqueuses de soude et de carbonate de soude

Théoriquement, l'extraction de la vanilline devrait être totale dès que le point de virage à la thymolphtaléine de la solution des graisses est atteint, puisque dans ces conditions la vanilline est elle-même titrée. En pratique, l'extraction au laboratoire par une solution de soude ou de carbonate de soude n'est jamais totale, si on n'ajoute pas un excès d'alcalis.

Cet excès, doit atteindre au moins 20% pour la soude et plus de 100% pour le carbonate de soude.

L'extraction de la vanilline par des solutions d'alcalis forts ne pose apparemment pas le même problème que pour l'extraction du sésamol.

Les excès en alcalis exigés étant de loin moins importants, la formation de savons pourra être réduite.

4.3.2. Extraction par l'eau ammoniacale

L'extraction de la vanilline par l'eau ammoniacale est une technique courante d'extraction de ce produit.

On peut considérer que la vanilline d'un beurre vanillé est extraite par des solutions d'ammoniaque analogue aux solutions de soude.

Cependant les solutions ammoniacales dégagent des quantités importantes d'ammoniac à la chaleur et il est donc indispensable d'utiliser des concentrations notablement plus grandes que les concentrations théoriquement nécessaires.

Si on extrait deux parties de beurre vanillé (200 gr/tonne) par 1 partie d'ammoniaque sensiblement N/20 (5 cc NH₄OH concentré/litre), l'extraction est quasi totale, sans provoquer l'apparition notable de savons. Si on extrait 4 parties de beurre vanillé par 1 partie de la même solution d'ammoniaque, l'extraction atteint encore environ 80% de la quantité de vanillé initiale et la formation de savons est quasi nulle.

5. Techniques d'élimination de la vanilline de la matière grasse

5.1. Elimination par des solvants

La sensibilité de la technique de mise en évidence de la vanilline par chromatographie en couche mince est telle que son élimination par des solvants, théoriquement facile, est cependant rendue ardue, l'élimination devant être presque totale si on veut empêcher la mise en évidence de traces.

Les difficultés sont d'ordre pratique plutôt que d'ordre théorique.

Il est indispensable que les deux conditions ci-dessous soient remplies:

- a) Il faut éviter une saponification importante ou parvenir par des procédés industriels à éliminer pratiquement tous les savons pour garder à la matière grasse, un goût acceptable commercialement.
- b) Il faut obtenir une séparation très complète des phases grasses et aqueuses.

Les techniques de centrifugation modernes, en particulier celles dont disposent les laiteries, permettent de satisfaire assez aisément à la deuxième condition.

La première condition par contre est un peu difficile à réaliser.

Les solutions de soude, à concentration égale enlèvent plus de vanilline que les solutions ammoniacales ou les solutions de carbonate, mais elles provoquent une saponification plus intense. L'excès de soude à ajouter, en vue d'obtenir une extraction pratiquement totale, excès calculé par rapport à la quantité nécessaire à la neutralisation des acides gras, est cependant très faible et on peut certainement envisager sur le plan industriel une extraction de la vanilline par des solutions diluées de soude.

Pour notre part, afin de réduire le plus possible la formation de savons nous avons procédé à des essais semi-industriels d'extraction de la vanilline par des solutions de carbonate de soude ou d'eau ammoniacale. Industriellement cependant, rien n'empêche d'utiliser des solutions de carbonate plus concentrées.

5.1.1. Essais semi-industriels d'extraction de la vanilline par lavages répétés par une solution de carbonate de soude

a) Essai sur 8 kg de butter oil vanilliné (200 gr/tonne)

Technique: 2 lavages à la solution de carbonate suivis d'un rinçage à l'eau pure.

Alcalinité de l'eau de lavage: 150% de l'A.M.G.

Température des eaux de lavage et de rinçage: 65 - 75°C

Rapport matière grasse/solution de lavage: 1/4 pour chaque lavage.

Le 1er lavage enlève 160 gr vanilline/tonne de beurre

Le 2e " " 24 gr " "

Le rinçage " 6 gr " "

Ce procédé permet donc l'élimination de 190 gr/tonne, soit 95% de la vanilline contenue dans la matière grasse à raison de 200 gr/tonne.

b) Essai sur 30 kg de butter oil vanilliné (200 gr/tonne)

Technique: idem à l'essai ci-dessus, mais le rapport matière grasse/solution de lavage et de rinçage était égal à 1/2.

Le dernier rinçage était suivi d'une récupération centrifuge de la matière grasse diluée (2 parties de matière grasse pour 1 partie d'eau).

Le 1er lavage enlève 126 gr vanilline/tonne

Le 2e lavage enlève 35 gr " "

Le rinçage enlève 9 gr " "

La récupération centrifuge 2 gr " "

Au total 172 gr de vanilline/tonne sont enlevés par ce procédé soit 86% de la vanilline totale au lieu de 95% selon le premier procédé.

On constate qu'en application industrielle, l'extraction a tendance à diminuer.

Les procédés d'extraction de la vanilline par de telles solutions de carbonate de soude sont à notre sens insuffisants, eu égard à la sensibilité des techniques de mise en évidence, mais ils permettent au moins d'éliminer suffisamment de vanilline dans un beurre tracé à 200 gr/tonne, pour que l'odeur ne soit plus perceptible. Ils peuvent probablement être améliorés; cependant l'extraction à l'eau chaude, dans des conditions semblables à celles du premier procédé permet déjà à elle seule une élimination de plus de 75% de la vanilline.

L'extraction de la vanilline par les solutions diluées de Na₂CO₃

(150% de l'A.M.G.) n'est donc guère rentable par rapport à l'extraction par l'eau chaude pure.

5.1.2. Élimination de la vanilline contenue dans une matière grasse traitée par lavages répétés à l'eau ammoniacale

Si on lave une partie de matière grasse à 65 - 70°C par deux parties d'eau ammoniacale (10 ml NH₄ OH concentré/litre), on parvient à éliminer 97% de la vanilline en un seul lavage. Ce même résultat est atteint à une température de 45 - 50°C avec une solution d'ammoniaque deux fois moins concentrée.

On peut donc procéder à une élimination industrielle de la vanilline par des lavages suivant ce schéma ou suivant un schéma voisin.

La saponification est très faible et peut encore être réduite par l'emploi de solutions ammoniacales plus diluées et de volumes plus grands d'eau de lavage.

Les traces d'ammoniaque présentes dans la matière grasse sont enlevées par n'importe quel processus de désodorisation ou simplement sous l'action d'une élévation de température.

5.2. Élimination de la vanilline par élévation de la température

5.2.1. Élévation de la température sous pression ordinaire

La vanilline est très sensible à la lumière et à l'oxydation.

Les solutions alcooliques et aqueuses de vanilline doivent être gardées fraîches et à l'abri de la lumière. Les solutions fortement diluées destinées à servir de test ne doivent pas être utilisées sans contrôle, même gardées au frais, après une période de huit jours.

La vanilline bout à 285°C, avec décomposition partielle, sous pression atmosphérique.

Dans de la matière grasse maintenue à basse température et enveloppée dans un emballage de papier ou en matière plastique, la vanilline ne paraît se conserver très longtemps.

L'arôme de vanilline s'exhale très peu en dessous de 10°C et presque pas sous 0°C.

On le ressent fortement vers 15°C et davantage encore au fur et à mesure que la température s'accroît.

Le beurre vanilliné ordinaire (200 gr/tonne) exhale vers 60°C une odeur de vanilline très tenace qui se répand très fort dans l'atmosphère environnante.

Cependant, même gardé 24 h à cette température, le beurre vanilliné garde son arôme et les pertes en vanilline sont très faibles.

Les mêmes essais à l'étuve à 110 - 115°C ont permis en même temps d'étudier la disparition de la vanilline des beurres vanillinés.

Les "butter oils" commerciaux utilisés contenaient en effet, selon les prescriptions de la C.E.E., 200 gr de vanilline par tonne et 100 gr de sésamol par tonne.

La vanilline de 20 gr de matière grasse a été extraite par 10 ml d'eau ammoniacale (5 ml/litre) et déterminée par révélation à la benzidine après séparation par chromatographie en couche mince.

Rappelons les modalités suivantes:

1er lot: l'échantillon était étalé en couche de graisse de 1,4 cm d'épaisseur en flacon ouvert

2e lot: l'échantillon était déposé dans un tube ouvert sous une épaisseur de 7 cm

3e lot: l'échantillon était déposé dans le même tube fermé mais non scellé

La vanilline disparaît à une allure légèrement moins rapide que le sésamol.

La disparition de la vanilline du 1er lot, au 3e jour de conservation à 115°C, est totale comme celle du sésamol.

Elle est très importante dans le deuxième lot, dès ce 3e jour de conservation à 115°C (environ 50%).

Elle est encore réduite dans le troisième lot, au 4e jours (60 à 70% de la teneur initiale subsistent).

Un procédé simple d'élimination de la vanilline par élévation de la température, sous pression ordinaire, ne sera donc pas possible, car la matière grasse du beurre serait trop altérée. Cependant, l'influence de cette élévation de température sur le taux de disparition de la vanilline est très grande. Il est certain que si on élève davantage la température et si on travaille sous vide partiel, l'élimination sera plus complète et, simultanément, le risque d'oxydation ou d'altération sera moindre.

5.2.2. Élévation de la température sous vide poussé - "Stripping"

La vanilline sous 6 mm de mercure a un point d'ébullition de 140 - 145°C. Or le "stripping" ordinaire des huiles est effectué à des températures de l'ordre de 200 - 210°C, sous vide moyen de l'ordre de 5 à 6 mm (voir chapitre 4 - 3 de nos recherches sur le sésamol).

En conséquence la désodorisation par "stripping" enlèvera pratiquement aussi bien la vanilline que le sésamol d'une matière grasse.

Ce procédé qui n'exige qu'un investissement relativement réduit est aussi fort économique. Outre l'appareillage, il ne demande en effet que les calories nécessaires pour chauffer la graisse vers 200°C et une quantité très réduite de vapeur par rapport au volume de la matière grasse à extraire (+ 2 à 5% vapeur/heure).

Bien exécuté, il produit des huiles neutres de bonne qualité (3).

Nos essais de "stripping" des beurres vanillinés (200 gr de vanilline/tonne) effectués dans les mêmes conditions que pour les beurres tracés au sésamol (190°C, 1 mm, 5% eau/chaude, 1 h) confirment l'élimination pratiquement totale de la vanilline par ce processus de "stripping" en laboratoire. La matière grasse butyrique est légèrement oxydée mais commercialement récupérable. Au stade industriel (techniques plus élaborées) l'oxydation pourra probablement être évitée.

5.3. Élimination de la vanilline par entraînement à la vapeur

Nous nous rapportons sur ce sujet, à une note de R. Mestres sur la composition des extraits de vanille (8).

L'extraction de la vanille par distillation simple est difficilement quantitative, le coefficient de volatilité étant de l'ordre de 0,09 en solution aqueuse, mais on peut séparer 90% au moins de vanilline d'un extrait en le soumettant à un entraînement par la vapeur d'eau suffisamment prolongé pour que le distillat ait un volume d'au moins 50 fois la prise d'essai.

Nous avons pu effectivement constater que par entraînement à la vapeur, en employant des volumes d'eau plusieurs fois supérieurs à celui de la prise d'essai, on ne parvient à extraire que très peu de vanilline.

Dans de telles conditions, on ne peut évidemment penser éliminer la vanilline d'un beurre par une telle méthode.

3. Swern, Bailey's industrial Oil and Fat Products 3d Ed. Deodorization p. 897

8. R. Mestres; Ann. fals. fraud. p. 82 (1954)

III. LE β SITOSTEROL

1. Définitions et propriétés générales

Le β sitostérol ou 24 b éthyl cholestérol, est le principal stérol des graisses et des huiles végétales. C'est le Δ^5 stigmastène 3β -ol de formule brute $C_{29}H_{50}O$. Son point de fusion est de l'ordre de 138 à 140°C.

Nous n'avons pas trouvé de références quant à son point d'ébullition, mais on peut escompter qu'il est très proche de celui du cholestérol (360°C avec décomposition sous pression ordinaire). Il possède un épimère en C24, le γ sitostérol ou 24 a éthyl cholestérol, dont les propriétés physiques (point de fusion = 139°C) sont très voisines, les propriétés chimiques étant identiques. Le γ sitostérol est un des principaux stérols de l'huile de soya et un constituant mineur de la plupart des huiles végétales.

Les β et γ sitostérols ne sont pas séparés par les méthodes chromatographiques habituelles (stérols libres et acétates de stérols sur colonne de silicone). Comme ces techniques chromatographiques sont à la base de la détermination des sitostérols dans une matière grasse, nous considérons donc qu'il serait souhaitable que le règlement CEE n° 1390/69 de la commission du 18/7/69 exprime la quantité de sitostérols en bêta et gamma sitostérols ou en 24 (b et a) éthyl cholestérol par tonne de matière grasse, puisque les techniques d'analyses usuelles les détermineront de toute manière simultanément. Il faut se garder également de les exprimer en sitostérols totaux, d'autres composés, portant le nom de sitostérol (1, 2, 3) ou le bêta dihydro-sitostérol, pouvant être séparés des β et γ sitostérols.

Pour des raisons de commodité de langage, nous nous exprimerons uniquement en "sitostérols" en considérant que ce terme recouvre les β et γ sitostérols. Les sitostérols sont des phytostérols. Ils sont pratiquement absents des graisses animales alimentaire; (moins de 0,20%). En conséquence, ils peuvent être des révélateurs de la présence de graisses végétales dans des graisses animales.

Ils peuvent également servir comme traceurs de la matière grasse butyrique. Les sitostérols ne diffèrent du cholestérol, principal stérol des corps gras d'origine animale (98%) que par l'adjonction d'un groupement éthyl en C24. Ils ont donc les mêmes propriétés chimiques et sont précipités ensemble par la digitonine.

La précipitation par la digitonine est la technique de base appliquée en vue du dosage des stérols dans les corps gras (norme internationale F.I.L. 32. 1965 et 38. 1966).

Le facteur par lequel il faut multiplier le poids du digitonide pour obtenir la quantité de stérols correspondante est de 0,2393, soit en pratique 0,24 et même 0,25 (normes F.I.L.) pour le cholestérol et de 0,253, soit en pratique 0,25, pour les sitostérols.

2. Sitostérols commerciaux

2.1. Propriétés renseignées du sitostérol "D.R.T."

Les sitostérols commerciaux (sitostérol "D.R.T.") nous ont été fournis par la firme "Les Dérivés Résiniques et Terpéniques" à 40 Dax (France). Suivent les indications de cette firme, le sitostérol "D.R.T." contient plus de 95% de sitostérols totaux à très forte proportion de bêta sitostérol, accompagné principalement de β dihydro-sitostérol ou sitostanol. Son point de fusion au banc Kofler est de 138 à 140°C.

Sa teneur en eau, déterminée à 100°C pendant 3 heures est inférieure à 3%.

Le résidu d'incinération (cendres) est très inférieur à 0,1%.

Le dosage, basé sur la précipitation par la digitonine, donne un titre en sitostérols totaux anhydres supérieur à 95% (sur produit anhydre).

On a pris comme base de calcul: 1 gr de complexe correspond à 0,253 gr de sitostérols totaux anhydres.

2.2. Contrôle du sitostérol "D.R.T."

	<u>Indicat. de la firme</u>	<u>Nos essais:</u>	<u>Littérature</u>
Point de fusion (Büchi-Tottoli)	138°-140°C	137°8C	140°C
Point de fusion des acétates	-	122°8C	env126°C
Teneur en eau	< 3%	2,8%	
Titre en stérols totaux	> 95% (produit anhydre)	95,6-97,5% (produit naturel)	
Chromatographie gazeuse des stérols: sitostérols	-	93,5-95%	-

Nous considérons donc que le sitostérol "D.R.T." commercial contient au moins 95,6% de stérols totaux et au minimum 89% de sitostérols purs (89 à 93%). Il serait donc légèrement moins pur que les indications

de la firme ont tendance à le rapporter.

En pratique, l'addition de 300 gr de sitostérol "D.R.T." à la tonne équivaut donc à une addition de l'ordre de 270 à 280 g de sitostérols purs à la tonne.

3. Méthodes analytiques de détermination des sitostérols dans la matière grasse

3.1. Point de fusion des acétates de stérol - morphologie des cristaux de cholestérol et de phytostérols

Ces méthodes, comme il a été dit plus haut, reposent essentiellement sur la précipitation des stérols par la digitonine.

Le digitonide, après pesée en vue de la détermination de la teneur en stérols, est hydrolysé en stérols, ceux-ci étant éventuellement transformés en dérivés, tels les acétates de stérol ou les triméthylsilyl éthers.

La teneur en stérols totaux de la matière grasse du beurre est de l'ordre de 0,30 à 0,32%, si on emploie le facteur de multiplication 0,25, selon la norme internationale FIL 32. 1965. Elle est de l'ordre de 0,28 à 0,30% si on utilise le facteur 0,24 correspondant plus exactement au rapport du poids moléculaire du cholestérol à son digitonide.

Les normes de la Fédération Internationale de Laiterie ont été conçues, en réalité, non pour la détermination du sitostérol, mais pour la détermination de la présence de graisses végétales dans une graisse animale grâce aux phytostérols qu'elles apportent. Les sitostérols constituent toujours la grosse majorité de ces phytostérols.

Les points de fusion des acétates de phytostérols sont généralement substantiellement plus élevés que le point de fusion de l'acétate de cholestérol.

Les cristaux des phytostérols libres et du cholestérol ont des formes caractéristiques différentes.

En conséquence, la base de la méthode de détermination de la présence d'une graisse végétale au sein d'une graisse animale consiste dans l'observation d'un point de fusion des acétates de stérols trop élevé pour l'acétate de cholestérol et dans l'observation de cristaux de phytostérols ou de cristaux mixtes de phytostérols et de cholestérol.

Nous donnons, au tableau suivant, les points de fusion des principaux stérols animaux et végétaux et les points de fusion de leurs acétates.

<u>Stérol</u>	<u>P.F. (760 mm)</u>	<u>P.F. acétate (760 mm)</u>
Cholestérol	149°C	115°C
Brassicastérol	148°C	158°C
Campestérol	158°C	-
Stigmastérol	170°C	144°C
β sitostérol	140°C	126°C
γ sitostérol	148°C	137°C
Ergostérol	165°C	181°C

Selon la norme FIL 32. 1965, un point de fusion des acétates de stérols supérieur ou égal à 117°C, parallèlement à l'observation de cristaux mixtes de phytostérol et de cholestérol est une preuve d'addition de graisses végétales (soit de phytostérols).

Si le point de fusion des acétates est compris entre 115,5 et 117°C, on considère que l'échantillon contient des matières grasses végétales, uniquement si ce point de fusion augmente après cristallisations successives. Si le point de fusion est compris entre 114°C et 115,5°C, on considère que la matière grasse est uniquement d'origine animale.

Suivant cette méthode on peut déceler environ 5% de phytostérols dans un mélange cholestérol-phytostérols.

La méthode FIL 32.1965 peut donc être appliquée aux beurres tracés par des sitostérols, où elle servira de test de la présence de ces traceurs.

3.2. Chromatographie sur couche mince des acétates de stérols

Cette technique a été normalisée par la Fédération Internationale de Laiterie et constitue la norme internationale FIL 38.1966.

Les acétates de stérols préparés suivant la norme FIL 32 (voir ci-dessus) sont séparés par la technique de chromatographie en couche mince en phase inversée utilisant le système undécane-acide acétique - acétonitrile. Les acétates de stérols sont révélés par vaporisation d'une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique qui les colore en bleu foncé.

L'acétate de cholestérol possède la plus grande vitesse de migration et le bêta sitostérol la plus faible vitesse de migration.

Les conditions opératoires de chromatographie citée dans la norme FIL 38.1966 doivent être observées scrupuleusement. Elles sont assez onéreuses surtout, si elles doivent être appliquées en contrôle courant.

Néanmoins on décèle assez facilement 1% d'acétates de sitostérols dans un mélange d'acétates de stérols grâce à cette méthode.

3.3. Chromatographie gazeuse des acétates de stérols

Les acétates de stérols peuvent être séparés facilement par chromatographie gazeuse dans les conditions suivantes:

Colonne: acier inoxydable (ou verre) longueur: 2 m

diamètre: 3 mm

Phase stationnaire: silicone SE 30 ou SE 52 - Taux d'imprégnation 2 à 5%

Support: Aeropak 30 100 - 120 mesh (Chromosorb W. A. W. - DMCS).

Température de la colonne: env. 250°C.

Détecteur: ionisation de flamme: température 275 °C

Injecteur: température: env. 300°C

Volume injecté: environ 5 microlitres.

Les acétates de stérols sont dissous dans l'éther (concentration de l'ordre de 5%).

Dans ces conditions, les temps de rétention relatifs par rapport à l'acétate de cholestérol sont de 1,11 pour le brassicastérol, 1,27 pour le campestérol, 1,38 pour le stigmastérol, 1,60 pour les sitostérols (acétates).

Durée de l'analyse: environ 45 minutes.

Temps de rétention du cholestérol: environ 25 minutes.

L'appareil de chromatographie doit posséder un atténuateur de sensibilité permettant de diviser au moins par 100 la sensibilité utilisée pour enregistrer le pic du cholestérol.

Les pics des substances dont le temps de rétention est supérieur à celui de l'acétate de cholestérol seront les seuls à être mesurés, la surface totale étant représentative de la quantité totale de stérols injectés.

(Les pics précédant le pic du cholestérol sont le plus souvent des produits de décomposition).

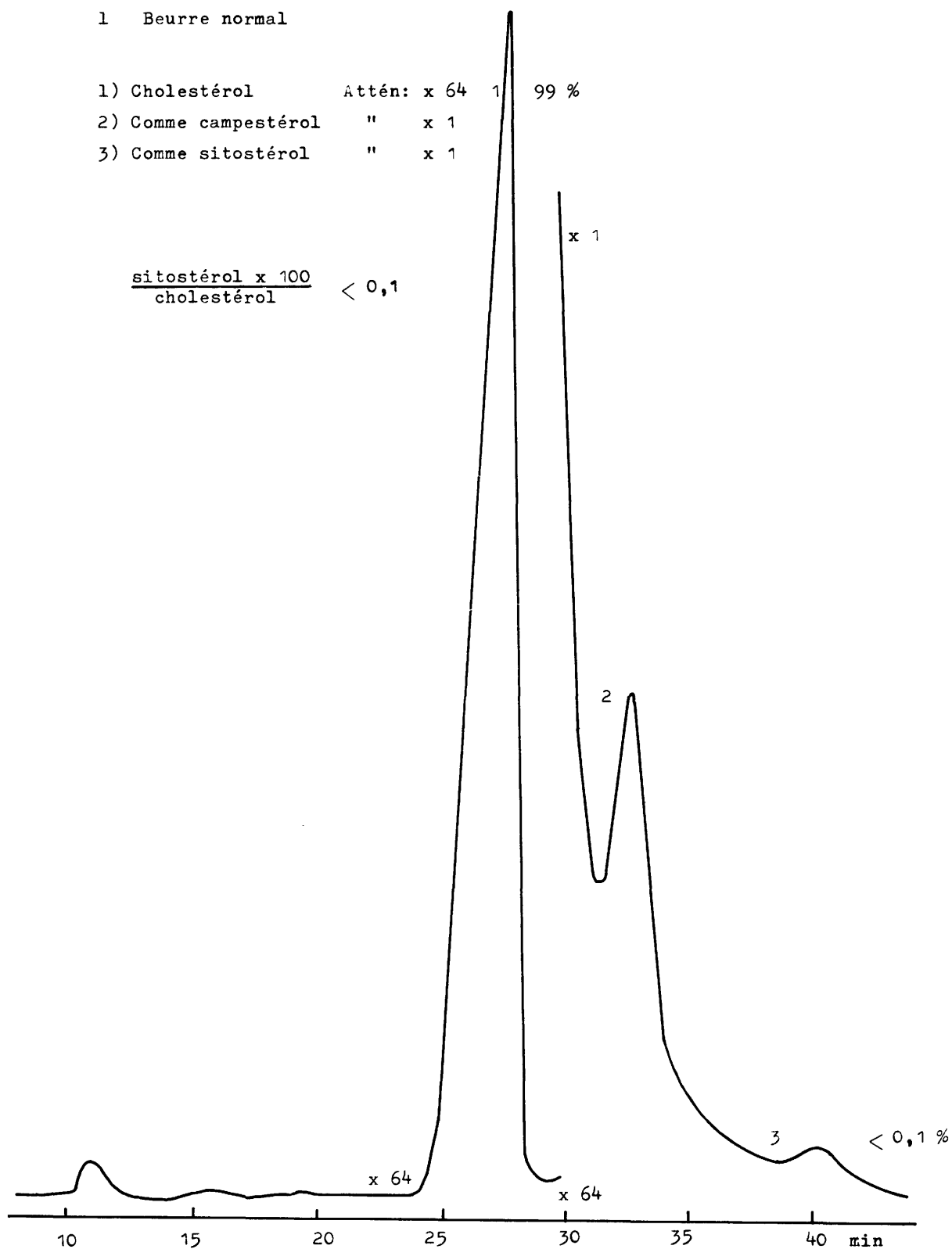
Dans de telles conditions opératoires, le pic atténué de l'acétate de cholestérol représente en général plus de 99% de la surface totale des pics des acétates de stérols animaux.

A. Chromatographie gazeuse des acétates de stérols - Chapitre 3.3.

1 Beurre normal

- 1) Cholestérol Attén: x 64 1 99 %
- 2) Comme campestérol " x 1
- 3) Comme sitostérol " x 1

$$\frac{\text{sitostérol} \times 100}{\text{cholestérol}} < 0,1$$

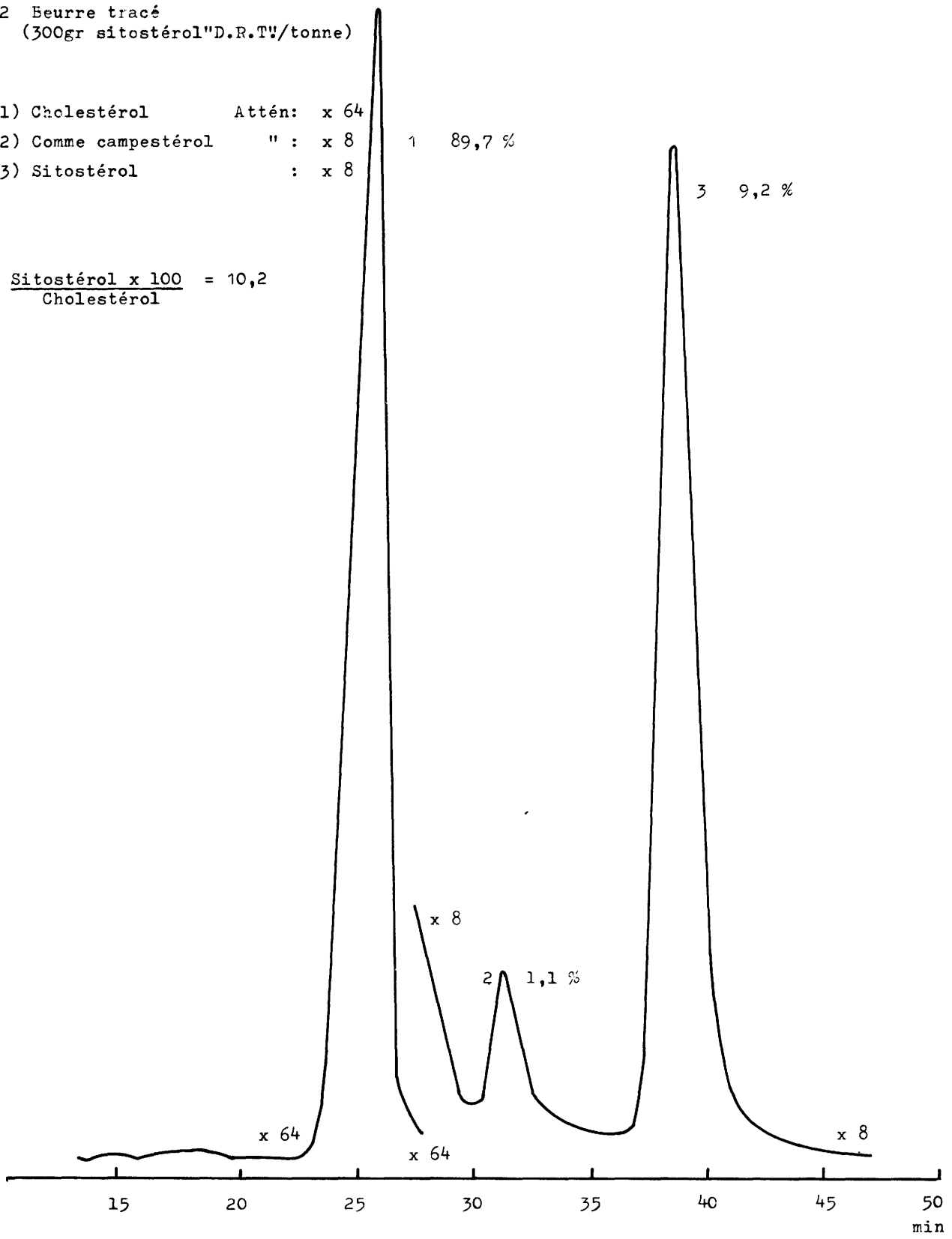


B. Chromatographie gazeuse des acétates de stérols - Chapitre 3.3.

2 Beurre tracé
(300gr sitostérol "D.R.T"/tonne)

- 1) Cholestérol Attén: x 64
- 2) Comme campestérol " : x 8 1 89,7 %
- 3) Sitostérol : x 8 3 9,2 %

$$\frac{\text{Sitostérol} \times 100}{\text{Cholestérol}} = 10,2$$

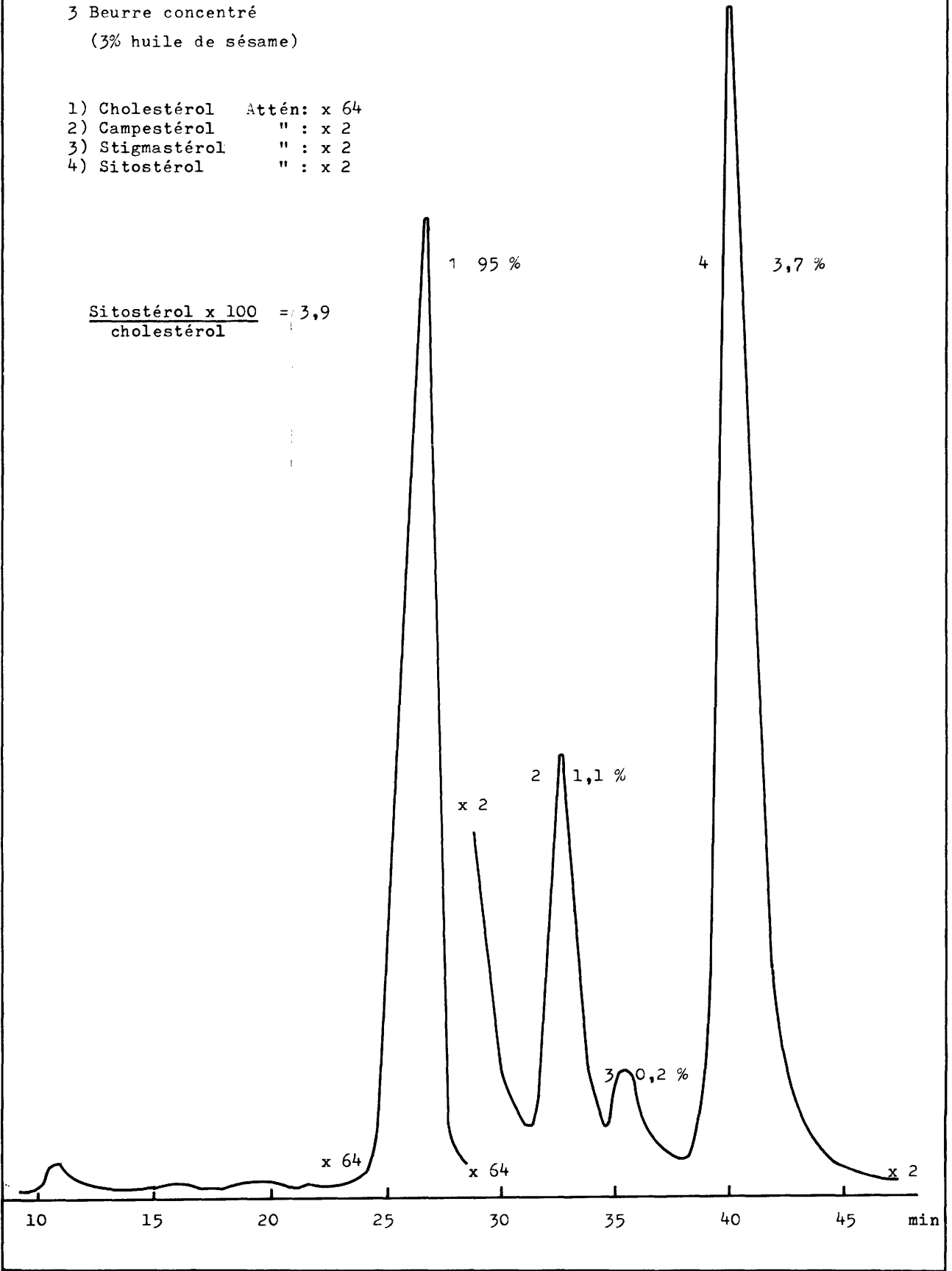


C. Chromatographie gazeuse des acétates de stérols - Chapitre 3.3.

3 Beurre concentré
(3% huile de sésame)

- 1) Cholestérol Attén: x 64
- 2) Campesterol " : x 2
- 3) Stigmasterol " : x 2
- 4) Sitostérol " : x 2

$$\frac{\text{Sitostérol} \times 100}{\text{cholestérol}} = 3,9$$



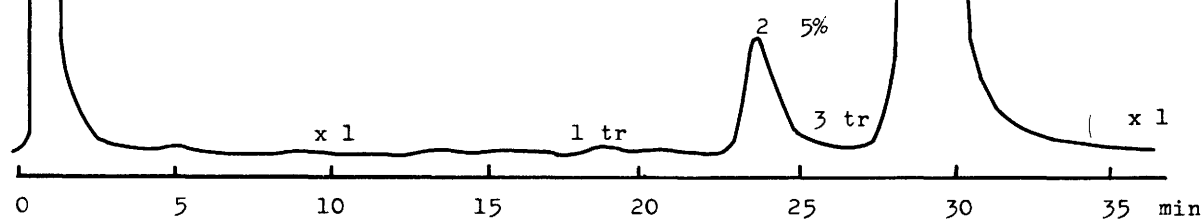
D. Chromatographie gazeuse des stérols - Chapitre 3.4

4 Sitostérol "D.R.T."

- | | |
|----------------------|------------|
| 1) Cholestérol | Attén: x 1 |
| 2) Comme campestérol | " : x 1 |
| 3) Stigmastérol | " : x 1 |
| 4) Sitostérol | " : x 1 |

4 94,5 %

Ether



Sur les chromatogrammes réalisés à partir de matières grasses butyriques pures, on observe un petit pic au temps de rétention égal à celui des sitostérols. Ce pic est de l'ordre de 0,1% de la surface totale et ne dépasse jamais 0,15%. On conclura à l'absence de sitostérols d'addition à la matière grasse butyrique, si l'aire atténuée correspondant aux sitostérols est inférieur à 0,2% de l'aire totale. Cette technique permet de déterminer environ 0,1% de "sitostérols d'addition" dans la matière grasse butyrique.

La chromatographie gazeuse des acétates de stérols est la méthode que nous avons employée le plus généralement pour la détermination du taux des sitostérols dans une matière grasse. Elle est beaucoup plus sensible que la méthode de détermination en couche mince et permet d'obtenir des résultats beaucoup plus précis en vue d'un dosage.

3.4. Chromatographie gazeuse des stérols

Cette méthode en voie de normalisation par la Fédération Internationale de laiterie a été utilisée récemment par S. Kuzdzal - Savoie à l'étude des stérols d'un beurre "dénaturé" au bêta-sitostérol (9).

Elle permet d'éviter la préparation des acétates de stérols à partir des digitonides.

Les digitonides sont détruits par action d'un solvant très polaire et les stérols purs recueillis sont analysés. Nous décrivons brièvement la technique utilisée:

Dans un petit tube, dissoudre 10 mg de digitonide dans 0,5 ml d'un mélange en parties égales de formamide et de diméthylformamide.

Chauffer légèrement si nécessaire. Ajouter à la solution froide 2,5 ml de n pentane. Agiter, puis laisser reposer le mélange.

La couche supérieure peut être utilisée directement pour l'analyse des stérols par chromatographie gazeuse.

Celle-ci est effectuée sur une colonne semblable à celles utilisées pour la détermination des acétates de stérols. Les conditions opératoires sont également sensiblement identiques.

Les temps de rétention calculés relativement au temps de rétention du

cholestérol sont approximativement:

cholestérol: 1 (15 minutes)
brassicastérol: 1,13 - 1,15
campestérol: 1,32 - 1,34
stigmastérol: 1,44 - 1,46
bêta-sitostérol: 1,66 - 1,68

La durée de l'analyse est de l'ordre de 30 minutes.

La chromatographie gazeuse des stérols suivant cette méthode est donc un peu plus rapide et demande également une préparation moins longue que la chromatographie gazeuse des acétates de stérols.

Les séparations sont cependant un peu moins nettes et les déterminations des taux des stérols seront moins précises.

En conséquence, nous ne l'avons pas appliquée pour nos essais où la plus grande précision possible était requise, mais cette technique peut être recommandée en vue de son application à un contrôle en série.

N.B. D'autres méthodes de détermination des stérols après transformation de ceux-ci en leurs dérivés triméthylsilyl (10) (11) peuvent être rencontrées dans la littérature mais il semble qu'elles soient plus complexes que les méthodes ci-dessus, sans apporter une précision supplémentaire.

4. Analyse des stérols des beurres "dénaturés" au sitostérol "D.R.T."

4.1. Dosage des stérols totaux

Le taux réglementaire d'addition de sitostérols à la tonne de matière grasse butyrique, soit 300 gr/tonne (règlement CEE 1390/69), correspond donc en réalité, vu la pureté des sitostérols utilisés, à un taux d'addition voisin de 290 gr de stérols totaux ou encore à 270 gr de sitostérols anhydres purs.

Le taux moyen de stérols totaux du beurre étant de 0,30 à 0,31% (taux calculé suivant la norme FIL 32.1965), une addition de 290 gr de stérols par tonne de graisse butyrique, correspond à une augmentation du taux de stérols de cette graisse butyrique d'environ 9,5%.

Cette hypothèse a été confirmée par l'observation du taux de stérols totaux sur une quinzaine de beurres dénaturés à raison de 300 gr de

10. G. Gerutti et al. La rivista italiana delle sostanze grasse 46, 356-362(1969)

11. L. Boniforti et al. Boll. Lab. Chim. prov. 20, 4, 279-287 (1969)

sitostérol "D.R.T." par tonne de graisse.

Les taux de stérols totaux s'échelonnaient entre 0,32 et 0,34%.

La dénaturation du beurre effectuée dans les conditions décrites ci-dessus, conduit donc à une augmentation moyenne du taux de stérols totaux d'un peu moins de 10%.

Cette augmentation est donc ordinairement décelable gravimétriquement suivant la méthode de la norme FIL 32.1965, si le taux de stérols totaux du beurre est un taux moyen de l'ordre de 0,30%.

4.2. Point de fusion des acétates de stérols et analyse microscopique

Une série de "butter oils" avec concentration décroissante de sitostérol "D.R.T." à partir de la dose réglementaire de 300 gr/tonne a été préparée.

Les stérols ont été isolés par précipitation à la digitonine.

La teneur en stérols totaux a été calculée et les stérols ont été transformés en acétates suivant la norme habituelle.

Les résultats suivants ont été obtenus:

<u>B.O. Commer-</u> <u>cial %</u>	<u>Sitostérol</u> <u>gr/tonne</u>	<u>Stérols totaux</u> <u>%</u>	<u>P.F. acétates</u> <u>(2 cristallisations)</u>
100%	300 gr/t	0,33	119°2C
50%	150	0,32	117°4C
25%	75	0,31	116°3C
16,7%	50	0,30	116°C
12,5%	37,5	0,30	115°7C
7,5%	22,5	0,30	115°C
0%	0	0,30	114°8C

Si on considère que les points de fusion sont établis à $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ près, suivant les résultats ci-dessus, on voit donc que le point de fusion des acétates de stérols est supérieur à $115^{\circ}5\text{C}$, ce qui est un indice de la présence de sitostérols, à partir de 22,5 gr de sitostérol "D.R.T."/tonne, correspondant à 12,5% de butter oil tracé commercial (300 gr/tonne) dans une graisse butyrique normale.

A partir de ce seuil, deux cristallisations supplémentaires augmentent le point de fusion des acétates au delà de 116°C .

A partir d'une teneur en sitostérol "D.R.T." de 75 gr/tonne, deux cristallisations supplémentaires augmentent le point de fusion au delà de 117°C .

La détermination de la présence de cristaux mixtes de cholestérol-phytostérols, au microscope ordinaire (grossissement linéaire = 200) est plus malaisée. Pratiquement, nous nous sommes aperçus que cette détermination était aléatoire, si le point de fusion des acétates n'atteint pas 117°C.

4.3. Analyse qualitative des acétates de stérols par chromatographie gazeuse

L'analyse chromatographique des acétates de stérols des "butter oils" tracés par 300 gr de sitostérols/tonne et par 150 gr de sitostérols/tonne a été effectuée suivant la technique décrite au chapitre 3.3. Cette analyse a donné les résultats suivants:

<u>Nbre éch.</u>	<u>Teneur en sitostérol "D.R.T."</u>	<u>Cholestérol</u>	<u>Campestérol et (ou) sitostanol</u>	<u>Sitostérol</u>	<u>Sitostérol Cholestérol</u>
6	300 gr/t	89,3 - 91%	0,6 - 1,2%	8,4 - 9,5%	9,4 - 10,5%
3	150 gr/t	94,3 - 95,4%	0,5 - 1%	4,1 - 4,7%	4,4 - 5%

Rappelons que sur les chromatogrammes des acétates de stérols des beurres purs, on peut remarquer un pic correspondant au temps de rétention de l'acétate de sitostérol. L'aire de ce pic ne dépasse pas en général 0,1% de l'aire du pic de l'acétate de cholestérol.

L'aire du pic relatif au temps de rétention de l'acétate de campestérol (ergostérol, sitostanol) est difficilement déterminable avec précision, ce pic correspondant à diverses substances présentes sous formes de traces dans le beurre et se présentant en outre dans le "tailing" du pic de l'acétate de cholestérol. En conséquence, nous considérons comme plus simple et plus direct pour déterminer une addition de traceur, de mesurer les aires atténuées des pics de l'acétate de cholestérol et de l'acétate de sitostérol.

A partir de la mesure de ces aires, on calcule le rapport sitostérol x 100/cholestérol.

Ce rapport atteint au maximum 0,15 dans les beurres et est en moyenne inférieur à 0,1.

On conclura à une addition de sitostérols si le rapport est supérieur ou égal à 0,2.

La méthode ci-dessus a permis de déceler facilement 2% de butter oil tracé ordinaire (300 gr/tonne) dans une matière grasse butyrique pure, soit 6 gr de sitostérol "D.R.T." à la tonne. Le rapport sitostérol x 100/cholestérol est alors voisin de 0,28.

A la limite, 3 gr de sitostérol "D.R.T." à la tonne sont encore décelables, le rapport sitostérol x 100/cholestérol étant encore alors de l'ordre de 0,20 à 0,22.

5. Elimination des sitostérols de la matière grasse butyrique

Les sitostérols comme le cholestérol sont des corps sensiblement neutres, très solubles dans la matière grasse et les solvants des graisses, relativement insolubles dans l'alcool, pratiquement tout à fait insolubles dans l'eau. Ils constituent eux-mêmes une partie de l'insaponifiable des matières grasses. On ne peut donc les extraire à l'eau. La précipitation par la digitonine est une méthode de laboratoire déjà fort onéreuse et est donc totalement impensable dans la pratique industrielle.

En fait, seul un traitement thermique énergique pourrait probablement détruire une partie des sitostérols. Dans ce cas cependant, les sitostérols et le cholestérol, de formules presque identiques, vont subir des dégradations sensiblement équivalentes et le rapport sitostérol x 100/cholestérol ne sera guère modifié.

5.1. Elimination des sitostérols par élévation moyenne de la température sous pression ordinaire

Durant le chauffage à l'air libre (fritures) des huiles et des graisses, la teneur en stérols totaux peut diminuer considérablement (12)

Les stérols sont oxydés ou polymérisés en d'autres stéroïdes comme les cholestadiènes etc..., qui ne précipitent pas avec la digitonine.

Après un chauffage excessif, la teneur en stérols peut finalement tendre à s'annuler. En outre, la structure des stérols non détruits peut être altérée.

Nous avons effectué quelques essais de chauffage de matières grasses de beurres tracés à raison de 150 gr de sitostérol "D.R.T." par tonne à des températures de 115 à 120°C. Les matières grasses avaient été déposées dans des tubes en verre fermés (non scellés), pour réduire l'oxydation.

Après 8 jours de conservation à cette température, la teneur en stérols totaux était passée de 0,32 à 0,285%, correspondant à une diminution d'un peu plus de 10% des stérols totaux.

Par contre le point de fusion des acétates de stérols (117°4C - 117°6C) et le rapport sitostérol x 100/cholestérol (4,3 - 4,6) étaient pratiquement restés inchangés.

5.2. Elimination des sitostérols par forte élévation de température sous pression réduite "stripping"

Le facteur principal d'altération des stérols, n'est pas en général la température élevée, mais plutôt, l'oxydation catalysée par l'élévation de la température.

En travaillant sous vide, on évite donc la principale cause d'altération des stérols et ceux-ci résistent assez bien à des températures de l'ordre de 200 à 250°C.

Le "stripping" des matières grasses effectué à des pressions de l'ordre de 5 mm et à des températures de l'ordre de 200°C enlève une partie des stérols. Suivant les données de la littérature (Bailey's industrial oil and fat products 3d Ed.), cette quantité est éminemment variable et fortement liée aux conditions de température, de pression et d'injection de vapeur de la technique de désodorisation par "stripping". Dans les conditions les plus sévères de "stripping" (températures supérieures à 250°C, pressions inférieures à 1 mm), jusqu'à 60% des stérols pourraient être enlevés. Dans les conditions de la pratique industrielle, l'élimination des stérols ne dépasserait cependant pas 15% des stérols totaux.

Notons que le cholestérol et les sitostérols, composés de structures quasi identiques, ont des points d'ébullition (avec décomposition à 760 mm) très voisins et supérieurs à 350°C.

On peut raisonnablement admettre qu'ils seront éliminés en proportions identiques, sous l'influence d'une élévation de température accompagnée d'un vide poussé et qu'en conséquence, la mesure du rapport sitostérol x 100/cholestérol, avant ou après "stripping", ne pourra pas donner des différences sensibles.

5.2.1. "Stripping" en laboratoire

Des essais de "stripping" ont été effectués en laboratoire sur des échantillons de 300 gr de graisse butyrique tracée par du sitostérol "D.R.T." à raison de 150 gr de sitostérol par tonne.

Les conditions opératoires étaient les suivantes:

Appareillage: selon Cocks et Van Rede (13)

Echantillon: 300 gr

Température: 190°C

Pression: 1 - 2 mm Hg

Injection d'eau chaude: 25 cc

Durée de l'opération: 2 h

Résultats

	<u>Avant "stripping"</u>	<u>Après "stripping"</u>
Stérols totaux	0,32%	0,30%
P.F. acétates (2 cristallis.)	117°4C	117°2C - 117°5C

Après "stripping", le "butter oil" reste de qualité commercialement très convenable.

La diminution de la teneur en stérols totaux de la matière grasse butyrique ayant subi un "stripping" de 2 heures dans les conditions décrites ci-dessus est de l'ordre de 7% seulement, alors que le même "stripping" appliqué pendant 1 heure seulement sur des "butter oils" tracés au sésamol et à la vanilline, élimine pratiquement la totalité de ces traceurs.

Le point de fusion des acétates de stérols, pratiquement inchangé après "stripping", indique que l'élimination des stérols n'est pas sélective (élimination légère et simultanée du cholestérol et des sitostérols, proportionnellement à leurs teneurs respectives dans le "butter oil" tracé).

Des conditions de "stripping" un peu plus sévères, telles qu'elles existent peut-être en industrie (température plus élevée) élimineraient peut être un peu plus de stérols.

Cependant, il est évident qu'on n'obtiendra pratiquement jamais une élimination très grande des stérols totaux, ni surtout une élimination sélective des sitostérols d'une matière grasse, par un processus industriel économique de "stripping".

Parmi les trois traceurs étudiés, à savoir le sésamol, la vanilline et le sitostérol, le sitostérol est donc certainement le seul qui ne soit pas pratiquement ni économiquement éliminable de la matière grasse butyrique.

6. L'emploi des sitostérols comme traceurs de la matière grasse butyrique et la mise en évidence de corps gras d'origine végétale

Les sitostérols étant les stérols les plus abondamment représentés parmi les stérols des huiles végétales alimentaires (55 à 96% suivant les cas), une addition à la matière grasse butyrique d'une quantité déterminée de certaines huiles végétales, pourrait également servir comme méthode de traçage. Inversement, on pourrait se demander si l'addition au beurre de sitostérols, comme traceur, ne peut pas masquer dans certains cas la présence d'huiles d'origine végétale.

Il faut souligner tout d'abord que, si on veut éviter toute confusion entre une addition de matières grasses d'origine végétale dans une matière grasse butyrique et une addition de sitostérols comme traceur, des méthodes comme la détermination du point de fusion des acétates et l'examen microscopique des cristaux de stérols sont totalement inefficaces. Seul un examen détaillé de la composition des stérols par chromatographie gazeuse peut donner des résultats significatifs.

Toutes les huiles végétales contiennent les deux types de stérols principaux, à savoir les sitostérols et le campestérol. La plupart des huiles alimentaires courantes d'origine végétale contiennent du stigmastérol.

Seules, parmi les huiles végétales alimentaires ordinaires, les huiles de colza et de crucifères, les huiles de coton et d'olive ne contiennent pas de stigmastérol ou n'en contiennent que des traces.

Le sitostérol "D.R.T." également, ne contient pas de stigmastérol ou n'en contient que des traces. En conséquence, la présence de stigmastérol parmi les stérols d'un beurre tracé ou non avec du sitostérol "D.R.T." est un indice certain de la présence de graisses d'origine végétale dans ce beurre. La présence d'huile de colza sera facilement décelée, par la présence de brassicastérol, les stérols de cette huile en contenant un taux important (10%).

La présence d'huiles de coton ou d'olive additionnée au beurre dans des proportions bien calculées sera bien plus difficile à déterminer.

Les chromatogrammes des stérols de l'huile de coton et de l'huile d'olive sont fort semblables aux chromatogrammes des stérols du sitostérol "D.R.T.". Les stérols de l'huile de coton contiennent 91 à 92% de sitostérols, 8% de campestérol et moins de 1% de brassicastérol.

Les stérols de l'huile d'olive contiennent 96 à 97% de sitostérol et 3 à 4% de campestérol.

On peut dire que la pureté en sitostérols des stérols de l'huile de coton est semblable à celle du sitostérol "D.R.T." tandis que la pureté en sitostérols de l'huile d'olive lui est même légèrement supérieure.

Il n'existe pas, dans ces huiles, d'autres stérols (la présence de traces de brassicastérol est toujours difficile à mettre en évidence dans un mélange de graisses animales et végétales) qui pourraient rendre suffisamment nette, une différence de composition des stérols entre les beurres tracés au sitostérol "D.R.T." et les beurres additionnés de quantités déterminées d'huile d'olive ou de coton.

Les stérols totaux de l'huile d'olive sont en moyenne de l'ordre de 0,15% et les stérols totaux de l'huile de coton sont de l'ordre de 0,30%.

Si on considère que les puretés en sitostérols, des stérols de l'huile d'olive, des stérols de l'huile de coton et du sitostérol "D.R.T." sont pratiquement identiques, on peut estimer qu'une tonne d'huile d'olive contient approximativement l'équivalent en sitostérols purs de 1500 gr de sitostérol "D.R.T." et qu'une tonne d'huile de coton contient approximativement l'équivalent en sitostérols purs de 3000 gr de sitostérol "D.R.T.". En conséquence, suivant un calcul théorique, il faudrait ajouter dans la matière grasse butyrique environ 20% d'huile d'olive ou 10% d'huile de coton, pour obtenir un effet similaire à celui obtenu à partir de 300 grammes de sitostérol "D.R.T." par tonne. La présence d'une telle quantité de matières grasses étrangères dans la graisse butyrique, pourrait être naturellement déterminée par d'autres techniques.

Il est pratiquement exclu qu'on puisse utiliser de telles huiles végétales en de telles proportions comme produit de substitution des sitostérols, en tant que traceurs de la matière grasse butyrique.

Si on porte la dose réglementaire de 300 gr à 600 gr de sitostérol par tonne de graisse butyrique à dénaturer, il faudrait alors ajouter 40% d'huile d'olive ou 20% d'huile de coton dans du beurre normal, pour obtenir un effet similaire sur la composition des stérols. A plus forte raison encore, une telle addition d'huiles végétales comme produit de substitution du traceur "sitostérol" est à exclure sur le plan pratique.

N.B. - L'utilisation de phytostérols autres que bêta sistérol, comme traceurs de la graisse butyrique, peut être également envisagée. Le stigmastérol, par exemple, possède certaines qualités de traceur, légèrement plus accentuées encore que celles du bêta sistérol, dont en particulier les points de fusion du composé lui-même et de ses acétates. Ses qualités analytiques seraient comparables, encore qu'il soit moins aisément séparé d'autres stérols par chromatographie et donc moins facilement dosable. Son prix serait cependant beaucoup plus élevé.

IV. LES CHLOROPHYLLES

1. Définition et règlement communautaires

Le règlement (CEE) n° 1732/69 de la Commission du 1er septembre 1969, prévoit l'incorporation de chlorophylle pure (E 140) dans certaines préparations commerciales contenant 20 à 39% de matière grasse provenant du lait. La chlorophylle E 140 est définie comme étant le complexe magnésien de la tétraméthyl 1-3-5-8 éthyl 4 vinyl 2 céto 9 carbométhoxy 10 phytyl propionate 7 phorbine (chlorophylle a) et de la triméthyl 1-5-8 formyl 3, éthyl 4 vinyl 2 céto 9 carbométhoxy 10 phytyl propionate 7 phorbine (chlorophylle b). Les chlorophylles a et b sont les pigments verts des plantes supérieures où elles participent au processus de la photosynthèse.

Suivant la lettre du règlement, les chlorophylles a et b sont donc considérées comme les seuls éléments dont le pouvoir traceur est reconnu et peut être estimé dans les préparations commerciales de ces produits.

En fait, les chlorophylles a et b sont des produits éminemment instables et leur dégradation commence dès leur extraction par les différents solvants organiques.

Les chlorophylles sont très sensibles à la lumière et à l'oxydation.

Leur extraction dans des buts analytiques doit se faire à l'obscurité et dans une atmosphère non oxydante.

Les chlorophylles purifiées coûtent excessivement cher, se vendent en flacon scellé, sous atmosphère inerte, par très petite quantité, et sont donc commercialement non utilisables.

2. Propriétés physiques des chlorophylles a et b

Les chlorophylles sont solubles dans l'acétone, l'éther diéthylique, l'alcool éthylique absolu, le benzène, le chloroforme. Elles sont très peu solubles dans l'éther de pétrole et insolubles dans l'eau.

La chlorophylle a est insoluble dans le méthanol froid tandis que la chlorophylle b est plus soluble et nettement soluble dans le méthanol chaud.

La chlorophylle a, séparée en chromatographie sur couche mince, présente une couleur vert bleuâtre caractéristique, tandis que la chlorophylle b est vert jaunâtre. En dilution dans les solvants organiques, les chlorophylles confèrent leur teinte caractéristique aux solutions.

Les solutions chlorophylliennes donnent une fluorescence intense dans le

rouge quand on les excite par des sources lumineuses de 340 à 440 nm.

Les chlorophylles peuvent d'ailleurs être caractérisées par leur spectre d'absorption ou même leur spectre de fluorescence.

Le spectre d'absorption de la chlorophylle a dans l'éther diéthylique, présente des valeurs maximale vers 660 - 614 - 576 - 532 - 429 et 410 nm.

Le spectre d'absorption de la chlorophylle b dans l'éther diéthylique présente des valeurs maximales vers 643, 594, 549, 453 et 430 nm.

Le spectre de fluorescence de la chlorophylle a dans l'éther présente des valeurs maximales vers 668 nm et 723 nm et celui de la chlorophylle b vers 648 et 710 nm.

Si on connaît les coefficients d'absorption dans l'éther des chlorophylles a et b aux différentes longueurs d'onde, on peut calculer les proportions de chlorophylle a, de chlorophylle b et donc de chlorophylles totales a + b, dans une solution chlorophyllienne, pour autant qu'il n'y ait pas d'interférence due à l'absorption par d'autres constituants dans la solution chlorophyllienne.

En pratique, les extraits végétaux de chlorophylle contiennent toujours de nombreux caroténoïdes.

Il faudra donc choisir les longueurs d'onde où on effectuera les mesures, là où l'absorption due aux caroténoïdes est nulle ou pratiquement nulle.

Ainsi, suivant ces critères, Zscheile et Comar (14) ont établi une méthode de dosage des chlorophylles a et b, basée sur la lecture des densités optiques à 642,5 et 660 nm, où l'interférence des carotènes est nulle.

Les formules sont les suivantes:

chlorophylle a (mg/l) = $9,93 \log_{10} \frac{I_0}{I}$ à 660 nm - $0,777 \log_{10} \frac{I_0}{I}$ à 642,5 nm

chlorophylle b (mg/l) = $17,6 \log_{10} \frac{I_0}{I}$ à 642,5nm - $2,81 \log_{10} \frac{I_0}{I}$ à 660 nm

chlorophylle totale (mgr/l) = $7,12 \log_{10} \frac{I_0}{I}$ à 660 nm + $16,8 \log_{10} \frac{I_0}{I}$ à 642,5nm

Ces formules sont actuellement d'un emploi généralisé et la méthode de Zscheile et Comar est reprise dans les "Official Methods of Analysis of the A.O.A.C." 9th Ed. 6.100 p. 115 (1965).

Cette méthode n'est malheureusement applicable qu'à des solutions de chlorophylle pure, donc fraîchement préparées et non aux solutions des dérivés de la chlorophylle, c'est à dire, en fait, les préparations commerciales.

14. Zscheile, P.F. and Comar C.L. Bot. Gaz 102, 463 (1941)

3. Les chlorophylles industrielles

Les chlorophylles industrielles sont obtenues à partir des feuilles d'épinards et d'orties (les plus riches en ces composés), qu'on épuise par l'alcool ou l'acétone.

Après élimination par traitement avec divers solvants des pigments indésirables, on obtient la "chlorophylle industrielle" dite pure, qui est un mélange de chlorophylle a et b, avec un rendement d'environ 6,6 g par Kg de feuilles traitées.

Cette substance bleu noir est insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool absolu et l'éther, moins soluble dans l'alcool à 95% et le méthanol et peu soluble dans l'éther de pétrole, mais s'y dissolvant facilement après addition d'une petite quantité d'alcool. Les solutions alcooliques sont vert bleuâtres et présentent une forte fluorescence rouge.

4. Les chlorophylles commerciales

On distingue les chlorophylles hydrosolubles et les chlorophylles oléosolubles (15).

4.1. Les chlorophylles hydrosolubles

4.1.1. Les chlorophylles cuivriques hydrosolubles

Il s'agit en réalité de chlorophyllines cuivriques, sodiques ou potassiques, les fonctions esters étant saponifiées. C'est le colorant E 141 européen, défini comme un complexe cuivrique des chlorophylles et des chlorophyllines.

Ce composé soluble dans l'eau se présente sous forme de poudre vert foncé, grasse au toucher.

On la dose en spectrophotométrie, en procédant à la mesure et au calcul de l'extinction spécifique à 405 nm, en solution aqueuse, sachant que la chlorophylle pure donne une absorption spécifique de 113.

La richesse des chlorophylles cuivriques commerciales en substances pures varie de 60 à 90%.

La chlorophylle cuivrique hydrosoluble E 141, ne peut contenir de cuivre libre ionisable ou tout au plus 200 mg par kg.

15. J.A. Gautier et P. Malangeau: Mise au point de chimie analytique 13e série
Les colorants naturels et de synthèse 191 (1964)

4.1.2. Les chlorophylles non cuivriques hydrosolubles

Ce sont les chlorophyllines, dérivés magnésiens de la chlorophylle, dans lesquels les fonctions esters ont été saponifiées. Le titre varie de 20 à 90%.

4.2. Les chlorophylles liposolubles

Ce sont des extraits mous dont le titre s'apprécie par la détermination de la teneur en azote (la substance pure titrant approximativement 6,4% d'azote).

4.2.1. Les chlorophylles non cuivriques liposolubles

Ce sont les phéophytines, c'est à dire les produits naturels où le magnésium a été éliminé. Le titre est souvent voisin de 15%.

4.2.2. Les chlorophylles cuivriques liposolubles

Ce sont les phéophytines cuivriques conservant leurs deux fonctions esters (phytol et méthanol). Leur titre varie entre 3 à 15% et la teneur en cuivre de 0,2 à 0,8%. Cependant pour les produits alimentaires, le taux de cuivre libre ionisable ne peut dépasser 200 mg/kg.

Les chlorophylles cuivriques sont obtenues à partir des extraits alcooliques de plantes vertes dans des récipients en cuivre, habituellement en présence de solutions aqueuses concentrées de sulfate de cuivre.

L'alcool éthylique est éliminé par distillation et on élimine une notable partie des hydrocarbures, des cires et des pigments par extraction au benzène.

Le résidu après distillation forme la base des différentes préparations commerciales.

5. Les chlorophylles liposolubles et leurs dérivés

Parmi les chlorophylles de la classification ci-dessus, seules les chlorophylles liposolubles retiendront notre intérêt puisqu'elles doivent être dissoutes dans la matière grasse pour servir de traceurs.

La chlorophylle E 140, telle qu'elle est définie par la réglementation communautaire est un mélange de chlorophylles a et b naturelles.

Or ces chlorophylles sont très instables et ne se conservent que moyennant une préparation et un conditionnement excessivement sévères.

Déjà, au moment de l'extraction au solvant, il y a formation de dérivés. Dans une matière grasse qui possède toujours une certaine acidité, les chlorophylles naturelles ne peuvent se conserver, et au taux prescrit par le règlement CEE n° 1732/69, elles seraient pratiquement immédiatement transformées en dérivés, principalement en phéophytines.

Il est utile ici pour la compréhension des chapitres suivants, d'énumérer avec une définition sommaire, quelques produits importants parmi les dérivés des chlorophylles.

- a) Phéophytines: Dérivés des chlorophylles naturelles a et b obtenus en milieu acide par élimination du magnésium qui est remplacé par H₂. Les phéophytines n'existent pas naturellement dans les plantes mais on rencontre toujours des traces de phéophytines, lors de l'extraction à froid de feuilles vertes par l'acétone, mais alors le taux relativement à celui des chlorophylles ne dépasse généralement pas 1 ou 2%. Si on fait bouillir ces feuilles vertes 5 minutes à 100°C dans l'eau distillée, la quantité de phéophytines dépasse 30% (16).
- b) Chlorophyllides: Dérivés obtenus sous l'action de l'enzyme "chlorophyllase" présent dans tous les extraits de plantes supérieures. Cet enzyme hydrolyse la fonction ester portant le phytol en une fonction acide.
- c) Phéophorbides: phéophytines où le groupement phytol est hydrolysé et remplacé par une fonction acide.
- d) Chlorophyllines: Dérivés obtenus par saponification complète des chlorophylles: les deux fonctions esters des chlorophylles naturelles sont donc remplacées par des fonctions acides. Leurs sels (chlorophyllinates alcalins) sont solubles dans l'eau.
- e) Chlorophylles au cuivre, au zinc etc... Produits dérivés des chlorophylles naturelles par substitution au magnésium, du cuivre, du zinc etc... Ce sont les phéophytines de cuivre, de zinc etc...

16. M.F. Bacon and M. Holden: Changes in chlorophylls resulting from various chemical and physical treatments of leaves and leaf extracts, Phytochemistry 6, 193 (1967).

6. Les chlorophylles liposolubles commerciales

Nous nous sommes adressés à différentes firmes vendant des chlorophylles, leur demandant des échantillons de chlorophylle E 140 ou des échantillons de chlorophylle liposoluble.

Nous avons pu obtenir des chlorophylles cuivriques et des chlorophylles non cuivriques, celles-ci étant dénommées E 140.

L'analyse de la chlorophylle non cuivrique E 140, a révélé qu'il s'agissait en réalité d'un mélange de phéophytines et ^{que} par conséquent l'appellation E 140 devrait être incorrecte.

Notons ci-après sommairement les différents résultats des analyses qui ont permis d'aboutir à cette conclusion.

6.1. Analyse d'une chlorophylle commerciale dite "E 140"

6.6.1. Titre

Cette chlorophylle est un extrait de luzerne. Elle titre selon la firme 16% de chlorophylle. Ce titre doit avoir été obtenu de la manière dont on titre ordinairement, les chlorophylles liposolubles.

Nous avons déterminé la teneur en azote par la méthode Kjeldahl.

Nous obtenons une teneur moyenne en azote de 1,028%.

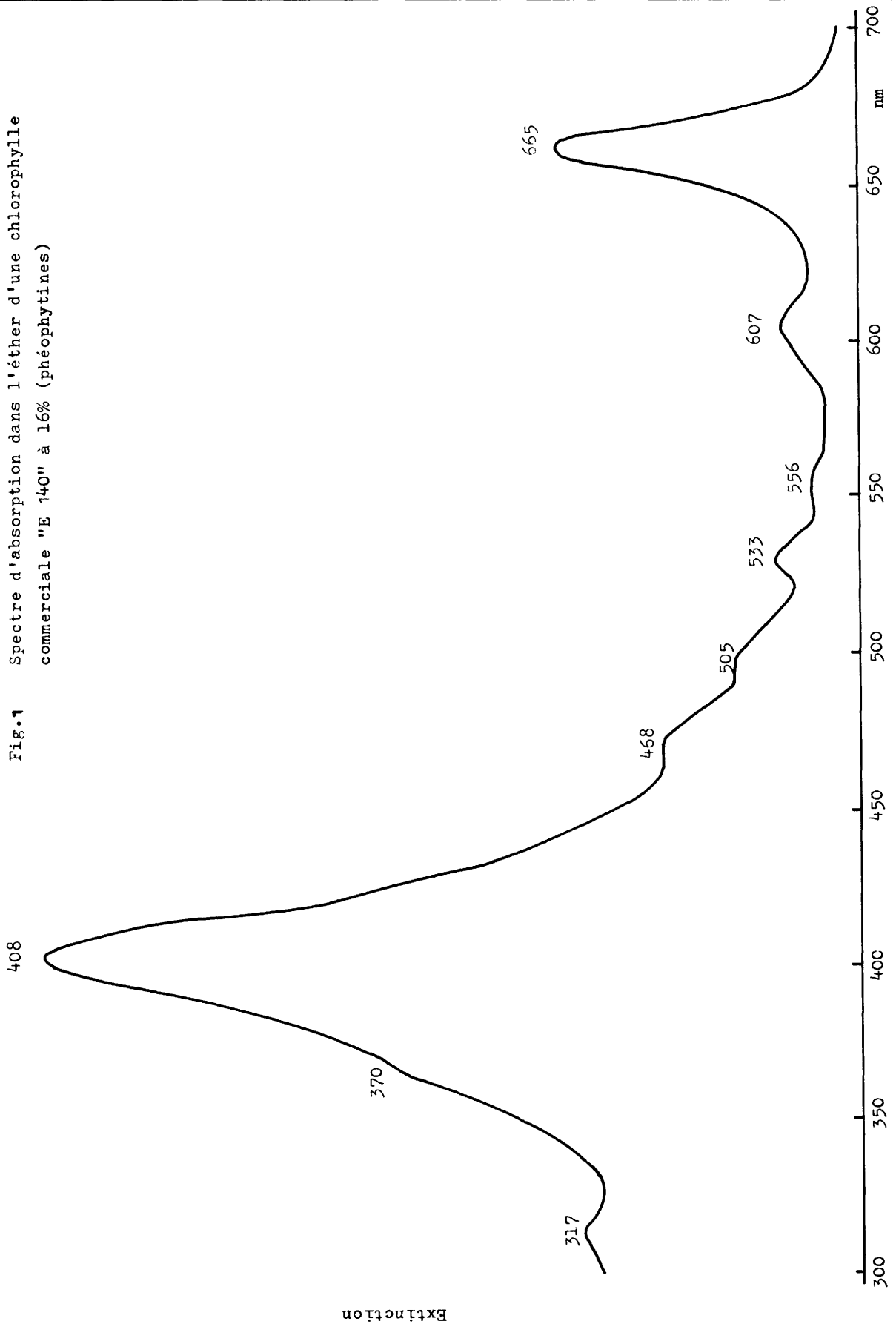
En considérant que la substance pure titre approximativement 6,4% d'azote (phéophytine a) on obtient un titre de 16 à 16,1%. Le titre commercial est donc exact.

Il convient donc d'en incorporer 50 gr tonne de graisse, pour répondre aux normes imposées par le règlement CEE n° 1732/69.

Cette chlorophylle liposoluble est produite dans les pays du Marché Commun et peut être livrée pour la dénaturation du beurre à un prix voisin de 6 U.C./kg.

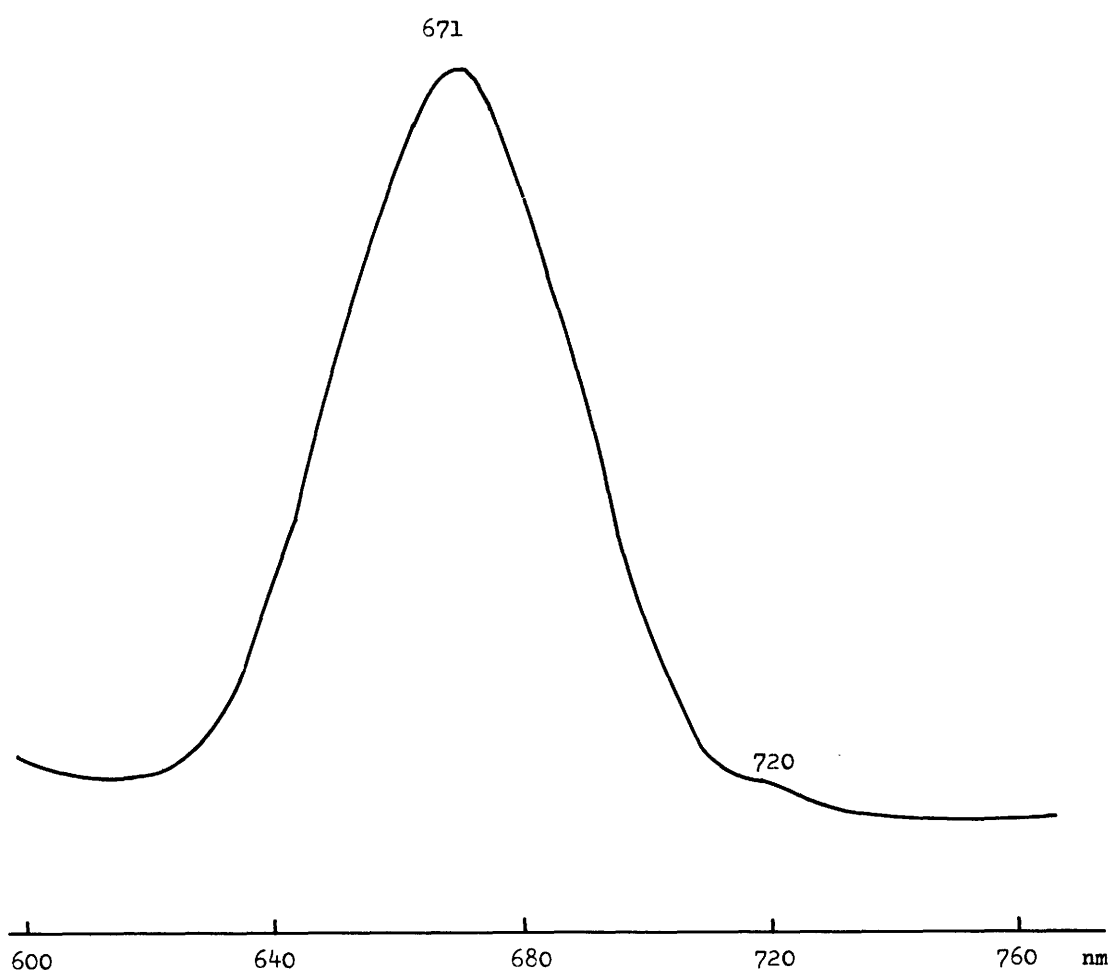
Cependant, le titre obtenu par une telle méthode n'a qu'une valeur relative; il ne peut y avoir en pratique d'autres composés azotés que les dérivés des chlorophylles dans la préparation commerciale, ce qui n'est pas démontré (En pratique, les processus d'extraction sont tels que ceux-ci sont négligeables). Le titre ne nous renseigne nullement sur la nature des dérivés des chlorophylles.

Fig.1 Spectre d'absorption dans l'éther d'une chlorophylle commerciale "E 140" à 16% (phéophytines)



Extinction

Fig. 2 Spectre de fluorescence dans
l'éther d'une chlorophylle E 140
à 16 % (phéophytines)



6.1.2. Le spectre d'absorption (Fig. 1)

150 mgr de chlorophylle commerciale E 140 à 16% ont été dissous dans un litre d'éther anhydre. Le spectre d'absorption a été tracé de 300 à 800 nm (fig. 1).

Le spectre d'absorption présente des valeurs maximales vers 665,5, 607, 556, 533, 505, 495, 468, 445, 430, 408 (extinction maximum) 370, 317 nm. Les maxima observés à 665,5 et 408 nm sont typiques de la contamination par des phéophytines.

Le spectre d'absorption ne présente d'ailleurs aucune des valeurs maximales qu'on observerait normalement pour les chlorophylles a et b. Par contre, une valeur minimum du spectre d'absorption est mesurée à 578 nm, correspondant à une valeur maximum d'absorption de la chlorophylle a. On peut conclure à l'absence de taux significatifs de chlorophylles naturelles (a et b) ou E 140.

Le spectre est d'autre part pratiquement celui de la phéophytine a, sauf le fait qu'il est légèrement déplacé vers les faibles longueurs d'onde et que le rapport des extinctions aux deux valeurs maximales de 665,5 et 408 nm, $E_{665,5 \text{ nm}} / E_{408 \text{ nm}}$, est nettement plus petit que pour la phéophytine a. Ces caractéristiques sont apportées par la présence au sein de la phéophytine a, d'un peu de phéophytine b.

6.1.3. Le spectre de fluorescence (fig. 2)

Le spectre de fluorescence dans l'éther diéthylique présente une valeur maximum vers 671 nm et une autre valeur moins bien mise en évidence vers 720 nm.

Ces valeurs sont aussi très proches de celles observées pour la phéophytine a. Leur léger déplacement vers les faibles longueurs d'onde (maxima de la phéophytine a dans l'éther: 673 et 723 nm (17)) est significatif de la présence d'un peu de phéophytine b.

6.1.4. Séparation des pigments par chromatographie sur couche mince

Les pigments de la chlorophylle commerciale E 140 examinés en chromatographie sur couche mince de cellulose (Merck 0,1 mm) avec comme éluant un mélange: éther de pétrole 60 - 80 - acétone - n propanol (90: 10: 0,45 (18)).

17. C.S. French: The chlorophylls in viro and un vitro: Handbuch der Pflanzenphysiologie 282 (1960)
18. M.F. Bacon: Separation of chlorophylls a and b and related compounds by T.L.C. on cellulose). J. Chromatog. 322 (1965)

La chlorophylle commerciale est dissoute dans l'éther diéthylique à raison de 2 g/l. On dépose au total 0,1 ml de cette solution en un trait continu sur une plaque de 20 x 10 cm.

On confirme que la phéophytine a est le constituant majeur (rf = 0,90). La phéophytine b est moins importante (rf voisin de 0,70), mais son taux reste significatif. Nous n'avons pu mettre en évidence les chlorophylles a ou b (rf respectifs d'environ 0,5 et 0,3).

La présence de phéophorbides est par contre indiscutable (phéophorbide a: rf: \pm 0,2), mais ils sont relativement peu importants.

Il y a aussi vraisemblablement un peu de chlorophyllides qui migrent à peine de la ligne de base.

Sur la ligne de base elle-même, demeure un spot important de matières grisâtres ou grises verdâtres donnant une fluorescence intense dans le rouge. Ces substances sont donc au moins en partie des dérivés des chlorophylles. Il ne s'agit pratiquement pas de chlorophyllides, la dégradation étant allée plus loin, mais sans doute de dérivés des chlorophyllines, les deux fonctions esters des chlorophylles ou des phéophytines étant remplacées par des fonctions acides.

D'autres produits fluorescents rouges apparaissent à l'état de traces quand on modifie la composition de l'éluant (diminution ou augmentation de la proportion d'acétone). Ce sont probablement des isomères ou des dérivés des phéophytines ou des phéophorbides.

Outre les dérivés de chlorophylles, on met également en évidence le β carotène (fort important) migrant en tête avec le front du solvant et plusieurs xanthophylles dont la lutéine et vraisemblablement la violaxanthine et la néoxanthine.

6.2. Synthèse des résultats analytiques et conclusions

De la série d'analyses effectuées ci-dessous, on déduit sans le moindre doute que la chlorophylle E 140 analysée est en fait un mélange de phéophytines a et b, avec une grande prédominance de la phéophytine a.

Le taux de chlorophylles naturelles a et b, peut en pratique être considéré comme nul.

7. Dosage des chlorophylles et des phéophytines

7.1. Détermination du titre par le dosage de l'azote

Si dans les préparations commerciales de chlorophylles, seuls les dérivés chlorophylliens sont susceptibles de contenir de l'azote, on peut les doser approximativement en déterminant l'azote total (chapitre 6.1.1.). La phéophytine a pure contient 6,43% d'azote, la phéophytine b 6,33%. On considère généralement que le mélange où prédomine la phéophytine a, titre 6,4% d'azote.

Une préparation commerciale à 16% doit donc contenir environ $6,4 \times 16/100$, c'est à dire 1% d'azote, ce qui a été vérifié.

Le titre ne peut donc être qu'approximatif et il se rapporte à tous les dérivés chlorophylliens pour lesquels il constitue une valeur maximum. Or l'aptitude en tant que colorants des graisses de tous ces dérivés est fort variable.

Les phéophytines donnent des couleurs plus ternes et plus jaunâtres que les chlorophylles.

Il en va de même des phéophorbides.

Les phéophytinates de cuivre donnent des colorations plus nettes, plus intenses et plus bleuâtres que les phéophytines proprement dites.

Les méthodes de dosage de ces produits font appel à la spectrométrie d'absorption et ne possèdent souvent qu'une valeur relative, étant donné leur faible stabilité.

7.2. Dosage par spectrométrie d'absorption

La teneur en chlorophylles d'une solution de celles-ci dans l'éther diéthylique peut être déterminée par la formule de Zscheile et Comar ou une formule analogue, pour autant que les dérivés des chlorophylles soient à des taux insignifiants ou nuls.

Si on applique cette formule à la préparation commerciale de chlorophylle E 140 analysée (titre = 16%), nous obtenons une teneur totale d'environ 4%, avec un rapport chlorophylle a/chlorophylle b supérieur à 6. Cette formule n'est pas applicable ici, puisqu'en fait, les produits chlorophylliens sont principalement des phéophytines.

On peut doser les chlorophylles a et b et leurs phéophytines dans un mélange de ces quatre constituants, même avec d'autres substances si

elles n'interfèrent pas en absorption aux longueurs d'onde choisies, et si on connaît les coefficients d'absorption spécifiques à ces longueurs d'onde des quatre constituants à doser.

Ces coefficients ont été déterminés expérimentalement par JHC Smith et col. et sont cités par French (17).

En opérant de la sorte, on obtient dans le cas présent, des taux pratiquement nuls et même souvent négatifs pour les chlorophylles a et b, ce qui confirme encore leur absence.

En considérant dès l'abord que le taux des chlorophylles est nul, on obtient deux équations à deux inconnues.

En travaillant sur une solution éthérée à 150 mg/l, on obtient

$$D_{665} = 61 \quad C_{\text{phéo a}} + 12,3 \quad C_{\text{phéo b}}$$

$$D_{655} = 20,4 \quad C_{\text{phéo a}} + 42,1 \quad C_{\text{phéo b}}$$

$$\text{D'où on tire} \quad C_{\text{phéo a}} = 0,0093 \text{ gr/l}$$

$$C_{\text{phéo b}} = 0,0027 \text{ gr/l}$$

La concentration en phéophytines totales serait de 0,012 gr/l ou 12 mg/l soit environ 8% dont 75 à 80% de phéophytines a et 20 à 25% de phéophytines b.

Des lectures faites à 610 nm et 535 nm (où l'absorption due aux carotènes interfère peu) donnent des résultats voisins, soit 9,8 mgr/l de phéophytine a et 3 mgr/l de phéophytine b, soit environ 8,5% de phéophytines totales avec approximativement les mêmes proportions de phéophytines a et b.

De nombreux autres indices, par exemple l'examen du spectre dans les régions de 410 et de 665 nm, confirment encore ces observations.

En fait, les chlorophylles et les phéophytines sont actuellement les seuls composés chlorophylliens dosables dans des préparations commerciales de chlorophylle, car ce sont les seules substances dont les coefficients d'absorption spécifiques ont été mesurés scientifiquement pour un nombre élevé de longueurs d'onde, au moins dans tout le spectre visible.

7.3. Dosage par fluorimétrie

La fluorimétrie peut être utilisée comme test ultra sensible de la présence de chlorophylles naturelles (E 140) ou des dérivés: la sensibilité de la méthode peut être poussée jusqu'à la détermination d'un microgramme de ces pigments par litre.

Aux faibles concentrations, l'intensité de la lumière émise en fluorescence est approximativement proportionnelle à la quantité de lumière absorbée, laquelle à son tour est approximativement proportionnelle à la concentration de la substance en solution.

Cependant, les chlorophylles a et b, leurs phéophytines et de nombreux autres dérivés des chlorophylles fluorescent indépendamment.

Pour une même longueur d'onde en excitation, le maximum de fluorescence est différent d'un dérivé chlorophyllien à l'autre; il varie d'ailleurs quelque peu selon le solvant, et les rapports des fluorescences émises à différentes longueurs d'onde d'excitation sont variables, suivant la longueur d'onde de la lumière d'excitation.

En conséquence, on^{ne} peut doser par fluorescence que les solutions chlorophylliennes de composition connue, où il n'existe qu'un ou deux composés, tels les chlorophylles a et b, et on est obligé de calibrer les courbes de fluorescence avec les résultats obtenus en absorption.

Dans le cas présent, nous considérons le titre commercial de 16% obtenu par dosage de l'azote comme référence.

La solution chlorophyllienne dans l'éther analysée (phéophytines) fluoresce entre 625 et 760 nm, avec une valeur maximum importante vers 671 nm et une valeur maximum plus faible vers 720 nm. Le maximum de sensibilité de la réponse en émission est obtenu pour une longueur d'onde d'excitation d'environ 404 nm.

Les substances organiques susceptibles d'être présentes dans les chlorophylles commerciales, en particulier, les caroténoïdes, ne fluorescent pas dans cette gamme de longueurs d'ondes.

En conséquence, au moyen de filtres appropriés (filtres rouges), on sélectionnera la partie du spectre au delà de 620 ou même au delà de 660 nm et on mesurera la fluorescence dans cette partie du spectre.

La fluorimétrie ne peut être considérée comme une méthode analytique précise, puisque la fluorescence est assez variable suivant la nature et les proportions des dérivés chlorophylliens. C'est une excellente

méthode de dosage par référence et un test ultra-sensible.

8. Stabilité de la chlorophylle commerciale E 140

Conservée au frais et à l'abri de la lumière, la chlorophylle commerciale dite E 140 est assez stable. En effet des échantillons ont été conservés au frigidaire (env. 8°C) et analysés après 6 semaines d'intervalle.

Le spectre d'absorption et les résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince sont pratiquement inchangés. Le titre reste invariable.

Par contre, une analyse d'un échantillon prélevé en fûts et laissé quelque peu à l'air libre à température ambiante, donne une diminution du taux de phéophytines d'environ 15%.

9. La chlorophylle commerciale E 140, en tant que colorant des corps gras alimentaires

Dans ce chapitre, nous considérons uniquement la chlorophylle liposoluble non cuivrique analysée, qui est vendue sous le nom de chlorophylle E 140, bien qu'il s'agisse en réalité, principalement de phéophytines.

Etant donné l'acidité des corps gras alimentaires et en particulier des beurres, il est d'ailleurs évident que les chlorophylles naturelles a et b ne peuvent s'y conserver, étant réduites très rapidement au stade de phéophytines. S'il y avait d'ailleurs la moindre possibilité de conservation, par exemple à des températures assez inférieures à 0°C en frigo, un simple chauffage de la graisse aux environs de 100°C les détruirait en quelques minutes. En conséquence, à notre avis, le règlement CEE n° 1732/69 n'est pas bien conçu, ou la définition de la chlorophylle E 140 est trop restrictive et doit s'étendre non seulement aux chlorophylles naturelles (magnésiennes) mais aussi à leurs dérivés exempts de magnésium, c'est à dire les phéophytines.

9.1. Les phéophytines (chlorophylle dite E 140) en tant que traceur immédiat

Les chlorophylles et leurs dérivés solubles dans la matière grasse lui confèrent une teinte caractéristique. Elles peuvent donc être considérées comme un traceur visuel et immédiat.

Les chlorophylles non cuivriques liposolubles, c'est à dire les phéophytines, donnent une teinte grise verdâtre assez terne.

Nous considérons qu'un bon traceur visuel doit permettre de déterminer 10% de graisse dénaturée dans un beurre normal. Un traceur analytique

devra permettre de déterminer moins de 5% et si possible 1 à 2% de graisse dénaturée dans un beurre normal.

Les dérivés des chlorophylles additionnés aux graisses, ont cependant été envisagés en ordre principal, comme traceurs visuels, ces traceurs visuels étant toujours accompagnés par un traceur analytique plus sensible, tel l'éthoxyquine (règlement CEE 1732/69).

Nous avons donc effectué des dilutions décroissantes de chlorophylle commerciale dite E 140, dans des mélanges de graisse butyrique, de saindoux et de graisse de boeuf. Les échantillons examinés contenaient 40% de graisse butyrique, 30% de saindoux et 30% de graisse de boeuf.

Il contenaient donc approximativement le taux maximum (39%) de graisse butyrique permis par le règlement communautaire.

Les dilutions suivantes ont été réalisées: 120, 60, 32, 24, 16, 8, 6, 4, 2 gr chlorophylle pure par tonne en tenant compte du titre commercial de 16%.

A température ordinaire, la teinte, due aux traceurs, est totalement imperceptible pour des dilutions de 2, 4, 6 et 8 grammes/tonne.

Elle commence à être perceptible à 16 gr/tonne. Elle se développe à 24 grammes/tonne; mais comme il s'agit d'une teinte terne grise, brunâtre et où ne prédomine en aucune façon le vert, nous la considérons encore comme insuffisante. A notre sens, elle ne peut être considérée comme efficace qu'aux environs de 32 grammes/tonne.

En conséquence, on peut affirmer que le règlement CEE n° 1732/69, en ce qui concerne le traceur chlorophylle, a totalement failli à son but qui était de trouver un traceur visuel immédiat, si on admet les phéophytines en tant que chlorophylle E 140.

La concentration de chlorophylle imposée, est non seulement trop faible (dans le beurre dénaturé normal, il en faudrait déjà environ quatre fois davantage, pour donner une teinte qui ne puisse prêter à discussion) mais à notre avis, la teinte grise, brun jaunâtre plutôt que verdâtre donnée par les phéophytines est trop peu caractéristique.

Nous avons pu calculer et vérifier expérimentalement que si on veut espérer mettre en évidence 10% de graisse dénaturée dans un beurre normal, il faudrait une concentration en phéophytines de l'ordre de 320 grammes/tonne; si le produit commercial titre 16%, il serait donc nécessaire d'ajouter en vue d'une dénaturation efficace, non pas 50 grammes de produit commercial à la tonne de graisse, mais environ 2 kg de ce même produit à la tonne de graisse.

9.2. Test de la présence de phéophytines par fluorimétrie

9.2.1. Examen direct

On a vu (chapitre 8.3.), que la fluorimétrie pouvait constituer un test très sensible de détermination des produits chlorophylliens issus des chlorophylles naturelles.

Les échantillons préparés ci-dessus ont été examinés en fluorescence directe, sous une lampe U.V. modèle Desaga, émettant principalement vers 360 nm.

Les échantillons ont d'abord été examinés vers 50°C où la graisse est fluide.

Aucune fluorescence rouge n'est perceptible pour les échantillons contenant: 2, 4, 6 gr/tonne. A 8 grammes/tonne la fluorescence rouge commence à apparaître. A 16 grammes/tonne, elle est nettement perceptible.

Les échantillons ont été ensuite solidifiés à température ordinaire (env. 20°C).

La fluorescence rouge apparaît un peu plus tard, et ne peut être considérée comme donnant un résultat efficace que vers 24 grammes/tonne.

L'examen de la fluorescence des beurres tracés, test très simple, pratiquement immédiat fournit une réponse un peu plus sensible que l'examen direct de la coloration.

Cependant, cet examen direct ne peut être pratiqué que si d'autres produits présents dans les beurres tracés ne viennent pas masquer la fluorescence rouge. Or, le règlement CEE n° 1732/69 prévoit l'addition d'un traceur analytique fluorescent, l'éthoxyquine, en même temps que l'addition de chlorophylle dans les beurres tracés.

L'éthoxyquine fluoresce intensément vers 420 nm (bleu violet) et masque la fluorescence rouge de la chlorophylle dans les beurres tracés, de sorte que l'oeil ne perçoit qu'une lumière bleue plus ou moins intense.

9.2.2. Examen immédiat

a) Mise en solution dans un solvant organique

On dissout la graisse dans un solvant (par exemple, 1 gr dans 100 cc d'éther de pétrole) et on examine la fluorescence rouge éventuelle sous la lampe U.V.

Cette méthode est développée au chapitre 11: Possibilités analytiques

de dosage des dérivés chlorophylliens.

Cette méthode permet facilement de se rendre compte de la présence de dérivés chlorophylliens si la graisse contient 8 gr de chlorophylle/tonne.

Elle est donc aussi sensible que la méthode directe (10 - 2 - 1), mais ne peut pas non plus être utilisée si l'échantillon de graisse contient de l'éthoxyquine.

b) Séparation des dérivés sur colonne de cellulose

On peut éventuellement éliminer l'éthoxyquine et les glycérides en faisant passer une solution de beurre tracé dans l'éther de pétrole, sur une colonne de cellulose. Les caroténoïdes, l'éthoxyquine et les glycérides sont entraînés très rapidement avec le solvant; les phéophytines elles-mêmes ne sont guère retenues.

Seuls restent adsorbés en haut de la colonne, les chlorophyllides et les dérivés des chlorophyllines et des phéophorbides.

Ceux-ci sont alors élués à l'acétone, à l'alcool. On recueille l'anneau verdâtre formé par ces composés dans un minimum de solvant.

La fluorescence de l'éluat a été mesurée et représente 20 à 30% de fluorescence totale de la préparation chlorophyllienne avant séparation.

Cette méthode indirecte peut être considérée comme un test d'une sensibilité plus grande encore de la présence de dérivés chlorophylliens dans une graisse que la méthode directe. Elle permet de retrouver deux à quatre grammes de dérivés chlorophylliens par tonne de graisse.

10. Possibilités analytiques de dosage des dérivés chlorophylliens par fluorimétrie

Cette technique, comme nous l'avons décrite, au chapitre n° 8.3., exige la possession d'une chlorophylle de titre connu, déterminé par une autre méthode.

Nous avons utilisé comme référence, la chlorophylle commerciale E 140 (phéophytines) à 16% de titre commercial. Il faut remarquer cependant que la fluorescence de la phéophytine a est plus intense que celle de la phéophytine b. Le maximum d'intensité de la fluorescence de la phéophytine a dans l'éther de pétrole se situe au-delà de 670 nm; celui de la phéophytine b se situe vers 660 nm.

En conséquence, la sensibilité sera d'autant plus grande que le taux de phéophytine a est plus important. Cependant le taux de phéophytine a est toujours de loin le plus important dans les chlorophylles commerciales non cuivriques liposolubles de sorte que la méthode reste valable avec une précision suffisante pour tous ces produits.

10.1. Modalités techniques

Nous avons utilisé un fluorimètre "Turner" modèle 110, équipé d'une lampe UV émettant principalement vers 360 nm, d'un filtre primaire de 360 nm et d'un filtre secondaire de 660 nm.

Notons cependant qu'on peut obtenir une sensibilité plus grande, si on dispose d'une lampe bleue émettant principalement entre 400 et 440 nm. Au-delà de 660 nm, on peut considérer que la lumière émise en fluorescence est due uniquement aux chlorophylles et à leurs dérivés.

1 gramme de graisse est dissous dans 100 cc d'éther de pétrole et la fluorescence de la solution peut être déterminée immédiatement au fluorimètre.

On a d'abord examiné la fluorescence de solutions de beurres témoins (1 gr/100 cc éther de pétrole) par rapport au solvant pur.

La déviation de l'aiguille ne peut dépasser deux graduations à gauche ou à droite du trait vertical. La lecture sera en moyenne de deux unités et ne dépassera pas quatre unités.

Des solutions de graisses tracées à la chlorophylle (2, 4, 6, 8, 16, 30, 40, 60, 80, 100 grammes chlorophylle/tonne) ont été ensuite examinées. Une solution à 2 grammes/tonne donnait une lecture de 2 à 3 unités, non différente de la lecture obtenue à partir d'un beurre témoin.

La réponse d'une solution à 4 grammes/tonne reste aussi trop peu sensible (lecture: 4 à 5) pour fournir des résultats non discutables.

Pratiquement, la fluorescence de telles solutions ne peut-être évaluée qu'à partir d'échantillons contenant 5 à 6 grammes de chlorophylle/tonne. La fluorescence reste proportionnelle à la concentration pour des solutions semblables jusqu'à des concentrations de plus de 100 grammes chlorophylle/tonne de graisse.

On constate donc que, même en connaissant les propriétés de la chlorophylle commerciale, il est difficile d'en effectuer le dosage par fluorimétrie dans un beurre, si celui-ci n'en contient pas au minimum 6 grammes/tonne. En pratique, on ne pourra donc pas rechercher la propor-

tion de beurre dénaturé suivant le règlement C.E.E. 1732/69, ajouté éventuellement à un beurre normal.

11. Possibilités d'élimination des chlorophylles commerciales du beurre

Les chlorophylles et leurs dérivés sont très sensibles à l'action de la lumière. Les chlorophylles naturelles a et b commencent à se dégrader immédiatement après leur extraction des plantes vertes. Cependant bon nombre de dérivés continuent à être fluorescents dans le rouge.

En conséquence, c'est par fluorimétrie, qu'on observera éventuellement la disparition progressive des dérivés des chlorophylles dans un beurre, sous l'action d'un traitement quelconque.

11.1. Action de la lumière

La teinte des phéophytines étant naturellement terne et celles-ci se dégradant beaucoup moins rapidement que les chlorophylles naturelles, il n'est pas concevable de les éliminer par l'action de la lumière, même accompagnée d'une élévation de température, dans un beurre tracé.

Le beurre s'oxyde et rancit plus vite que la teinte n'évolue.

11.2. Action de la chaleur et de l'oxydation

Des échantillons de graisses tracées par 64 grammes de chlorophylle/tonne ont été placés à l'étuve à une température de 100°C.

Certains se trouvaient en flacons fermés, d'autres en flacons ouverts. Dans les conditions des essais, il a fallu garder 5 jours les échantillons en flacons ouverts à 100°C, pour observer une diminution de 50% de la fluorescence. Pour les échantillons en flacons fermés, une telle diminution s'observait après neuf jours seulement.

On peut donc en déduire, soit que les phéophytines résistent passablement bien à la chaleur et à l'oxydation naturelle, soit plus vraisemblablement que les produits de dégradation formés continuent à être fluorescents.

11.3. Action des hautes températures sous vide poussé

Un "stripping" en laboratoire, d'un échantillon contenant 100 gr de chlorophylle/tonne a été réalisé. Les modalités opératoires étaient les suivantes:

Echantillon: 250 grammes
Température: 191°C
Vapeur: environ 20cc
Pression: 1 mm Hg
Durée: 1 heure

A la fin du "stripping" la teinte grise verdâtre de l'échantillon n'avait pas évolué et les résultats de l'analyse par fluorescence étaient eux-mêmes restés pratiquement inchangés.

On confirme donc de cette façon que l'action des hautes températures à l'abri de l'air et pendant un temps relativement court n'affecte donc pas les possibilités de mettre en évidence les chlorophylles commerciales dans une graisse.

11.4. Action des solvants

Les phéophytines sont solubles dans les graisses et les solvants des graisses. Elles sont tout à fait insolubles dans l'eau. Il sera donc impossible de les éliminer par extraction par un solvant quelconque, en particulier par des solutions aqueuses qu'elles soient basiques ou acides.

11.5. Filtration sur charbon actif

Les chlorophylles et leurs dérivés sont adsorbés sur charbon actif ou sur terres décolorantes. L'élimination des chlorophylles et des pigments est d'ailleurs une opération courante en huilerie. Nous l'avons réalisée expérimentalement en laboratoire sur des beurres dénaturés par 120 gr de chlorophylle/tonne et sur des solutions concentrées de chlorophylles allant jusqu'à 2% de chlorophylle commerciale dans l'éther de pétrole. La filtration industrielle ne demandera que relativement peu d'équipement et pourrait être réalisée par des "retravailleurs" de beurres.

12. Les chlorophylles cuivriques liposolubles

12.1. Les chlorophylles commerciales, leur titre et les exigences de la législation

Les chlorophylles cuivriques oléosolubles ne rentrent pas dans la catégorie des chlorophylles admises par le règlement communautaire n° 1732/69.

Cependant, il semble qu'elles soient d'un emploi bien plus généralisé que les chlorophylles non cuivriques. Elles confèrent en effet en tant que colorants alimentaires, une teinte bien plus franche, bleue verdâtre, que les chlorophylles non cuivriques.

Elles sont relativement stables.

Les préparations commerciales sont également assez différentes et peuvent contenir d'autres métaux. Suivant les législations des pays européens, elles ne peuvent contenir plus de 200 mg de cuivre ionisable par kg.

Nous avons pu obtenir une chlorophylle à 4% et une chlorophylle à 15% de deux firmes différentes de la CEE.

Le titre a été vérifié par dosage de l'azote total et s'est révélé approximativement exact (3,9 et 15,7%).

Un test indique que la teneur en cuivre ionisable est de loin inférieure à 200 mg/kg.

La chlorophylle à 4% est offerte à des prix de l'ordre de 7,6 à 10 U.C. le kg, suivant la quantité demandée.

La chlorophylle à 15% est offerte par une autre firme à des prix variant entre 30 et 35 U.C. le kg. On peut donc considérer que les prix commerciaux des chlorophylles cuivriques sont comparables.

12.2. Quelques analyses élémentaires

a) Le spectre d'absorption (fig. 3 et 4)

Les spectres d'absorption dans l'éther des deux chlorophylles à 4 et 15% sont retracés en figure 3 et 4. Ces spectres ont des valeurs maximales différentes, indiquant une composition différente.

Notons les valeurs maximales suivantes:

Chlorophylle à 4%: environ 637, 590, 530, 457, 408 nm

Chlorophylle à 16%: environ 678, 600, 540, 470, 417, 400 nm

b) La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince de cellulose (Merck; 0,1 mm) de la chlorophylle à 4% indique que celle-ci contient pratiquement exclusivement des chlorophylles a et b cuivriques, des chlorophyllides et chlorophyllines. Il y a relativement peu de caroténoïdes. Aucun dérivé n'est fluorescent dans le rouge.

Au contraire, la chlorophylle à 15% se compose de chlorophylles cuivriques et d'autres métaux. Il existe plusieurs dérivés qui fluores-

Fig. 3 Spectre d'absorption dans l'éther d'une chlorophylle
cuvrique liposoluble à 4%

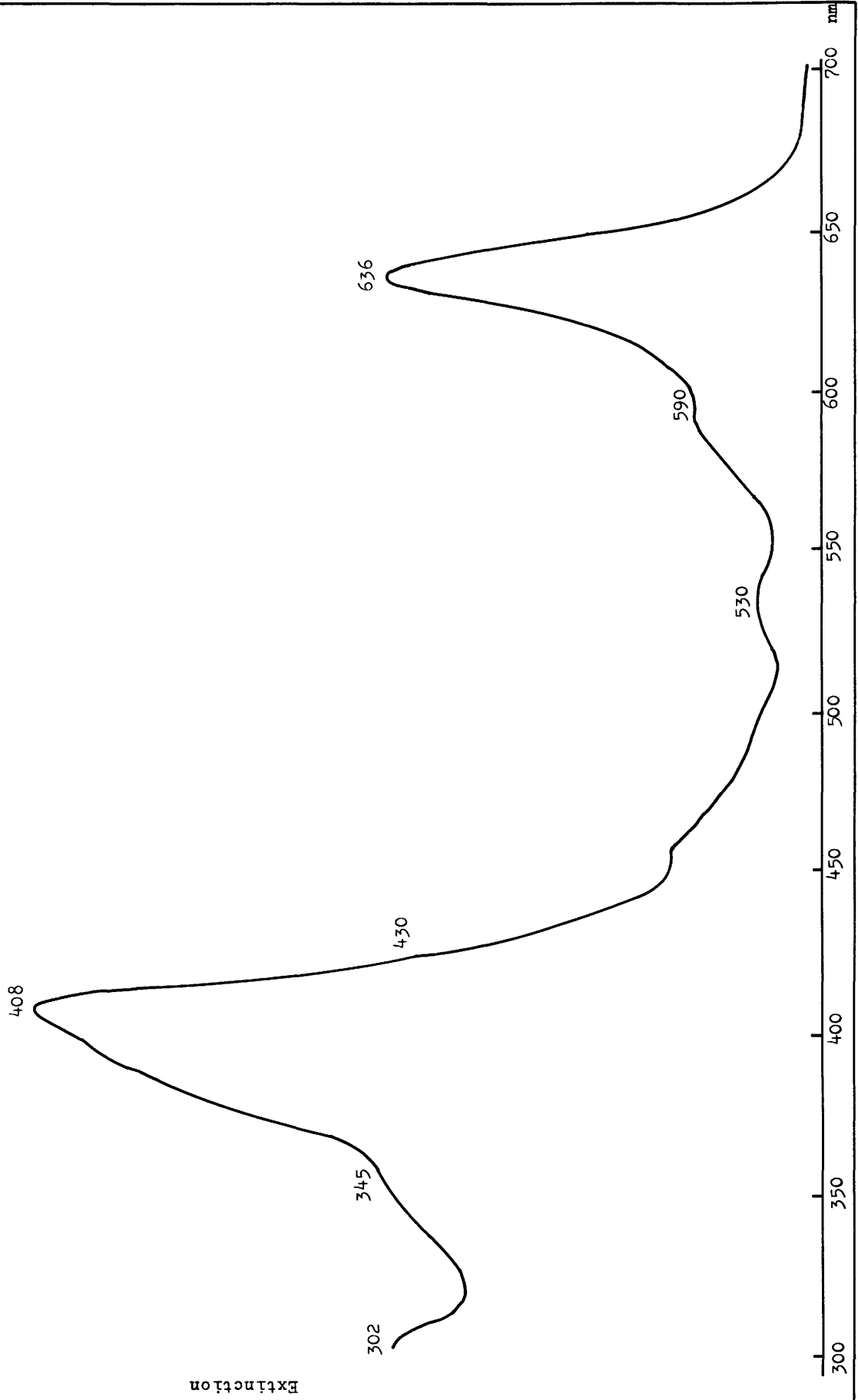
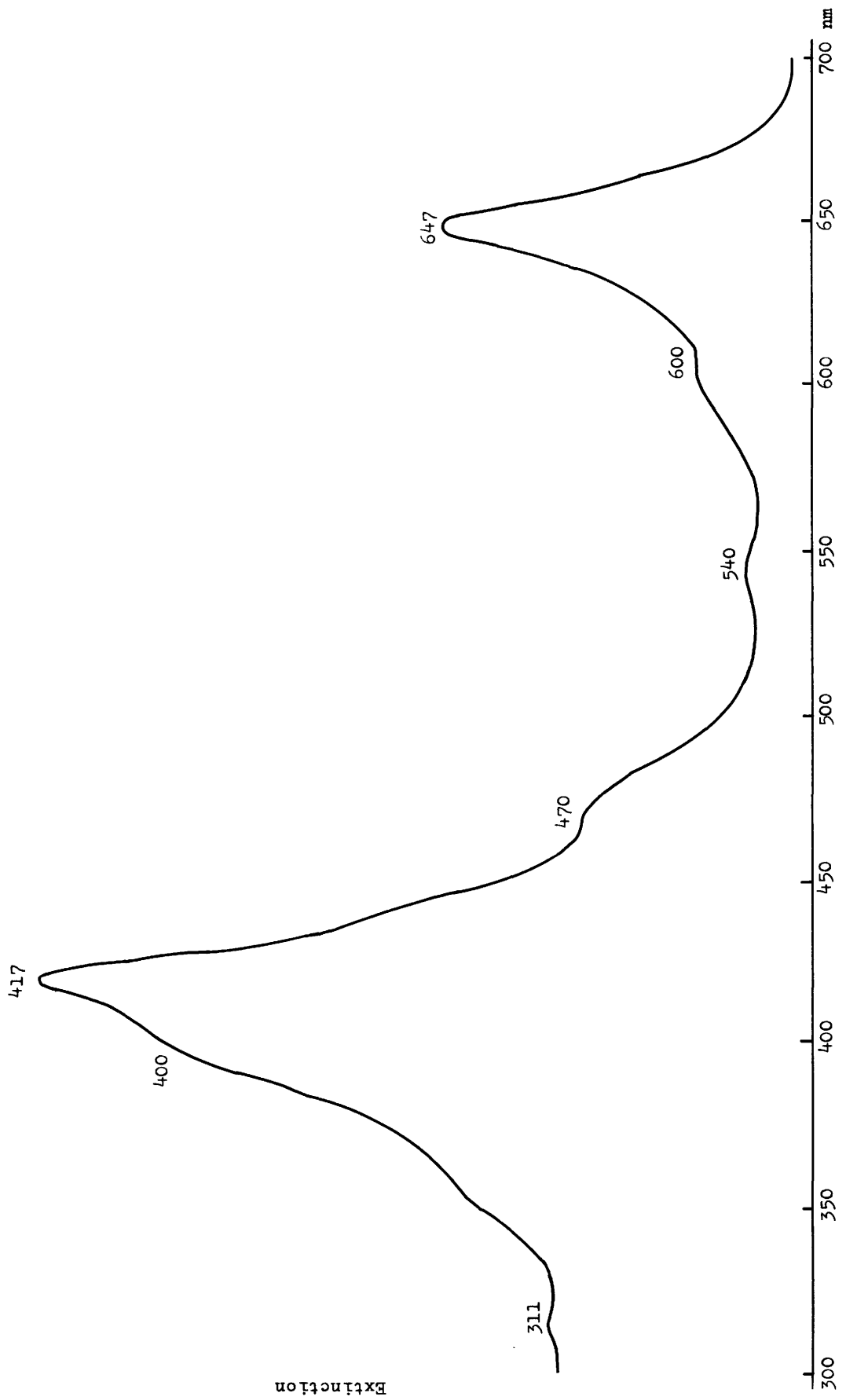


Fig. 4 Spectre d'absorption dans l'éther d'une chlorophylle
cuvrique liposoluble à 15%



Extinction

cent dans le rouge, entre autres des phéophytines et des phéophorbides.

Une chromatographie sur gel de silice laisse apparaître de nombreux pigments, carotènes et xanthophylles. Au moins 15 produits différents peuvent être séparés de cette façon.

12.3. Les chlorophylles cuivriques liposolubles en tant que colorants des corps gras alimentaires

12.3.1. Sensibilité du test visuel immédiat

Les chlorophylles cuivriques ayant une teinte verte bleuâtre beaucoup plus caractéristique et plus intense que la teinte terne des phéophytines, peuvent constituer un traceur immédiat des graisses bien plus sensible que les phéophytines.

On a effectué les mêmes dilutions de chlorophylles cuivriques dans des mélanges de "butter oil" de graisse de boeuf et de saindoux, qui avaient été réalisées à partir de phéophytines (E 140), soit 120, 60, 32, 24, 16, 8, 6, 4, 2 gr de chlorophylle cuivrique par tonne.

Les titres commerciaux de 4 et de 15% ont été pris comme référence.

La teinte due au traceur est totalement imperceptible lorsque la dose n'atteint que 2 gr/tonne. On commence déjà à percevoir une dose de 4 gr/tonne. A 6 grammes tonne, la teinte donnée par la chlorophylle à 15% devient vraiment caractéristique tandis que la teinte donnée par la chlorophylle à 4% reste un peu moins accentuée.

Pour cette chlorophylle, 8 grammes/tonne nous paraissent nécessaire pour donner une teinte verte indiscutable.

On constate donc, qu'à concentration égale, la teinte donnée par les chlorophylles cuivriques est au moins quatre fois plus rapidement perceptible dans les graisses que la teinte donnée par des chlorophylles non cuivriques (phéophytines).

En conséquence, on décèle facilement la présence de la chlorophylle cuivrique, dans un beurre additionné de 10% de beurre dénaturé contenant 500 grammes de chlorophylle cuivrique (vert bleu très intense) (à comparer avec les 2 kg de phéophytines/tonne).

On pourrait objecter l'inconvénient de la teneur en cuivre élevée, 0,2 à 0,8%, avec au maximum 200 mg de cuivre ionisable par kg.

Cependant, les chlorophylles ou leurs dérivés ne sont pas digérés par les ruminants et se retrouvent dans les excréments.

Le cuivre ionisable est un catalyseur d'oxydation des graisses, mais l'éthoxyquine, deuxième traceur ajouté aux graisses avec la chlorophylle suivant le règlement CEE 1732/69 est un antioxydant énergétique.

Il serait quand même contre-indiqué d'ajouter au beurre dénaturé destiné à l'alimentation humaine, sous l'une ou l'autre forme, un traceur contenant du cuivre, puisque celui-ci favoriserait fortement l'altération de la matière grasse. Cependant, les préparations commerciales envisagées par le règlement communautaire sont destinées à l'alimentation du bétail. Il est bon de rappeler d'ailleurs que l'éthoxyquine, n'est pas tolérée comme additif en alimentation humaine, au contraire de la chlorophylle cuivrique; celle-ci ne peut simplement contenir une teneur en cuivre ionisable, supérieure à 200 mg/kg.

12.3.2. Dosage des chlorophylles cuivriques dans les graisses

Le dosage des chlorophylles cuivriques dans les graisses pose un problème très difficile qui ne peut donner de réponses sensibles.

Les chlorophylles cuivriques ne sont pas fluorescentes, d'où on ne peut les doser par fluorimétrie. Leur spectre d'absorption est légèrement variable, d'où on ne peut choisir avec une garantie de précision une longueur d'onde déterminée pour y effectuer la mesure de l'absorption.

La mesure directe de l'absorption des graisses à différentes longueurs d'onde est possible. Encore faut-il disposer de spectrophotomètres spéciaux, munis de larges cellules pouvant être réchauffées.

Un tel dosage reste en fait pratiquement impensable pour presque tous les laboratoires analysant les produits laitiers et ne pourrait d'ailleurs être réalisé qu'avec une précision non suffisante.

12.3.3. Élimination des chlorophylles cuivriques des graisses

Les techniques possibles d'élimination des chlorophylles cuivriques des graisses sont exactement les mêmes que celles utilisées pour les phéophytines. Nous ne développerons donc pas ce chapitre en détails.

Rappelons que la seule méthode économiquement utilisable et très efficace d'éliminer les chlorophylles et leurs dérivés des graisses est de filtrer la matière grasse à chaud, sur une couche d'adsorbant tel que le

charbon actif. L'élimination est la plus facile si les graisses ont été préalablement neutralisées. Elle est aussi totale dans le cas des chlorophylles cuivriques, que que dans le cas des chlorophylles non cuivriques.

13. Conclusions

L'emploi des chlorophylles en tant que traceurs de la matière grasse butyrique

Il apparaît que le choix de la chlorophylle E 140 à la dose de 8 gr/tonne comme traceur de mélanges de corps gras contenant de la matière grasse butyrique (règlement CEE 1732/69), est absolument non judicieux pour de nombreuses raisons, dont nous retiendrons principalement celles-ci:

- 1) La chlorophylle E 140, est définie comme un mélange de chlorophylles naturelles a et b.
Or ces chlorophylles naturelles (magnésiennes) sont instables et ne pourraient se conserver dans les beurres.
On ne les rencontre pas dans le commerce en tant que chlorophylles liposolubles.
- 2) On livre dans le commerce sous le nom de chlorophylle E 140, des dérivés de ces chlorophylles, les phéophytines ou chlorophylles exemptes de magnésium. Ces phéophytines confèrent, même à des dilutions relativement élevées dans la matière grasse, une teinte gris brun verdâtre très terne, insuffisamment caractéristique vis à vis de la teinte des "butter oils", contenant assez bien de carotène.
A la dose de 8 gr par tonne de graisse, elles passent tout à fait inaperçues à la vue et ne sont même pas très facilement mises en évidence par des méthodes analytiques.
Pour qu'un tel traceur soit réellement efficace à la vue, c'est à dire qu'il permette la mise en évidence de 10% de beurre tracé dans un beurre normal, la dose devrait être portée à environ 320 gr de phéophytines par tonne, soit 2 kg d'un produit commercial à 16%, par tonne de corps gras.
Dans ce cas, la matière grasse possède évidemment une teinte vert noirâtre très accentuée.
- 3) Les préparations chlorophylliennes sont assez variables suivant les sources commerciales et ne peuvent être dosées ou même estimées avec une précision suffisante au sein des matières grasses.

Le titre, établi par dosage de l'azote, n'a pratiquement qu'une valeur commerciale et peu de valeur analytique, car il ne nous indique ni la nature des chlorophylles ou de leurs dérivés, ni leur teneur réelle.

La teneur globale en chlorophylles et en leurs dérivés qu'il est sensé représenter est approximative et peut être faussée par la présence ou par l'addition de composés azotés.

- 4) Les phéophytines et autres chlorophylles liposolubles peuvent être éliminées sans difficultés majeures de la matière grasse par filtration sur charbon actif ou terres décolorantes.

N.B. Les chlorophylles cuivriques liposolubles constitueraient un traceur visuel quatre à cinq fois plus sensible que les phéophytines.

Pour des titres équivalents, le prix est cependant d'un ordre cinq fois plus élevé. Nous préférons néanmoins l'emploi en tant que traceur, des chlorophylles cuivriques, car la teinte est plus caractéristique.

Les chlorophylles cuivriques sont aussi assez variables suivant les sources commerciales.

La présence de cuivre peut être un inconvénient, mais nous estimons qu'il n'est pas tellement important, les graisses tracées étant destinées à l'alimentation animale et contenant en outre un antioxydant, l'éthoxyquine.

Les chlorophylles cuivriques sont malheureusement aussi aisément éliminables de la matière grasse par filtration sur certains adsorbants que les chlorophylles non cuivriques.

- 5) Si on juge qu'il est quand même souhaitable de maintenir les chlorophylles en tant que traceurs immédiats des matières grasses, il est nécessaire de tenir compte des doses à préconiser pour rendre possible la détection de 10% d'un beurre tracé dans un beurre normal.

La dénaturation d'une tonne de mélange gras par 320 gr de phéophytines (chlorophylle E 140 à 16%) coûterait environ 12 U.C. (2 kg à 6 U.C.).

La dénaturation d'une tonne de mélange gras par 80 gr de chlorophylles cuivriques à la tonne coûterait environ 16 U.C. (2 kg à 8 U.C.) pour une chlorophylle à 4%.

Ces prix sont peut être encore accessibles, mais ils nous semblent tout de même relativement élevés pour des opérations de dénaturation des graisses destinées à l'alimentation animale.

6) Signalons enfin les difficultés juridiques qui pourraient surgir avec l'emploi de phéophytines ou d'autres dérivés des chlorophylles, non repris dans la liste des colorants officiellement admis par la Directive du Conseil du 11/11/62, modifiée en dernier lieu par la Directive du Conseil du 13/7/70.

V. L'ETHOXYQUINE OU SANTOQUIN

1. Définition et propriétés générales

L'éthoxyquine appelée aussi communément Santoquin (la firme Monsanto U.S.A. en possède un brevet de fabrication) est définie comme étant la 1 - 2 dihydro 6 éthoxy 2 - 2 - 4 triméthylquinoléine, de formule brute $C_{14}H_{19}NO$.

C'est un liquide jaune brunâtre visqueux à température ordinaire de point d'ébullition à 2 mm, 123 - 125°C.

On la prépare en faisant passer des vapeurs d'acétone dans une solution de p.phénétidine contenant 1% d'iode, vers 120 - 130°C, et on l'extrait par distillation. Elle est utilisée principalement comme antioxydant, mais aussi comme herbicide et agent antidégradant des caoutchoucs.

L'administration américaine, section des produits alimentaires et pharmaceutiques (F.D.A.) a accordé l'autorisation générale d'utilisation du santoquin dans les aliments destinés aux volailles et au bétail, ainsi que dans les fourrages déshydratés. La dose maximum tolérée est de 150 gr par tonne ou 0,015%.

La présence d'éthoxyquine retarde l'oxydation des carotènes et des xanthophylles, des vitamines A et E et empêche dans une certaine mesure la formation de peroxydes (rancidité).

L'éthoxyquine est soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le chloroforme, l'éther, l'éther de pétrole et les solvants des graisses. Elle est insoluble dans l'eau.

L'éthoxyquine possède du fait de son noyau quinoléique, un spectre U.V. caractéristique présentant un maximum d'absorption à 296 nm.

C'est en outre, un corps éminemment fluorescent vers 420 - 440 nm.

L'éthoxyquine est liposoluble et peut donc être diluée dans tous les corps gras employés dans les formules d'aliments pour bétail.

Cependant, sa basicité la rend facilement extractible de ces corps gras par simple lavage par des solutions aqueuses acides. Cette propriété, conjointement au spectre d'absorption U.V., est à la base d'une méthode de dosage de ce produit (19)(20).

(19) J.P. Wolf - Manuel d'analyse des corps gras p. 277 (1968)

(20) Choy T., Alicino N.J., Klein H.C., Quattrone J.J. Determination of ethoxyquin by U.V. spectrometry. Agric. and Food Chem. XI, 340 (1963)

Elle pourra être aussi malheureusement utilisée en vue de l'obtention d'une méthode d'élimination de l'éthoxyquine en tant que traceur des corps gras.

Le règlement communautaire CEE n° 1732/69 prévoit l'addition, simultanément à celle de la chlorophylle, de 150 grammes d'éthoxyquine par tonne de graisse. Notons que cette dose est la dose maximum tolérée par la F.D.A. Cependant, les graisses tracées suivant le règlement communautaire n° 1732/69 sont destinées à entrer dans la composition d'aliments pour le bétail. Dans ceux-ci, le taux d'éthoxyquine sera donc toujours de loin inférieur à 150 gr/tonne.

Le Santoquin se vend (liquide visqueux) à 100%, ou bien sous forme de mixture à 66% sur vermiculite. Le santoquin pur peut être obtenu à la "Monsanto Europe" au prix de 1,8 U.C. le kg, ce qui rend le prix de la dénaturation dérisoire. En tant que traceur des corps gras, c'est uniquement le produit pur liquide qui sera utilisé.

L'éthoxyquine, agent antioxydant, se dégrade donc sous l'effet des oxydants et de l'air en particulier.

Cependant, de nombreux produits d'oxydation continuent à être fluorescents.

2. Analyse de l'éthoxyquine commerciale

2.1. Le spectre de fluorescence (fig. 1)

Les spectres de fluorescence de solutions relativement concentrées (100 mgr/litre) et de solutions diluées (1 mgr/litre) d'éthoxyquine dans l'éther de pétrole ont été réalisés, avec une lumière d'excitation de 360 nm.

Le maximum de fluorescence se situe aux environs de 420 - 421 nm en solutions concentrées et aux environs de 417 - 418 nm en solutions diluées. Cette différence résulte probablement de l'oxydation plus rapide de l'éthoxyquine en solutions diluées, les produits d'oxydation présentant comme nous le verrons plus loin (chapitre 5.2.), leur maximum de fluorescence déplacé vers les courtes longueurs d'onde, vis à vis de l'éthoxyquine. En solution concentrée dans le méthanol (100 mg/l) le maximum de fluorescence se situe aux environs de 445 nm.

2.2. La chromatographie sur couche mince

L'éthoxyquine et ses principaux dérivés obtenus par oxydation, peuvent être séparés sur chromatographie en couche mince de gel de silice (Merck F 254 0,25 mm). Nous avons utilisé comme éluant, soit un mélange benzène-

Fig. 1 Spectre de fluorescence de
l'éthoxyquine (100 mg/l) dans
l'éther de pétrole

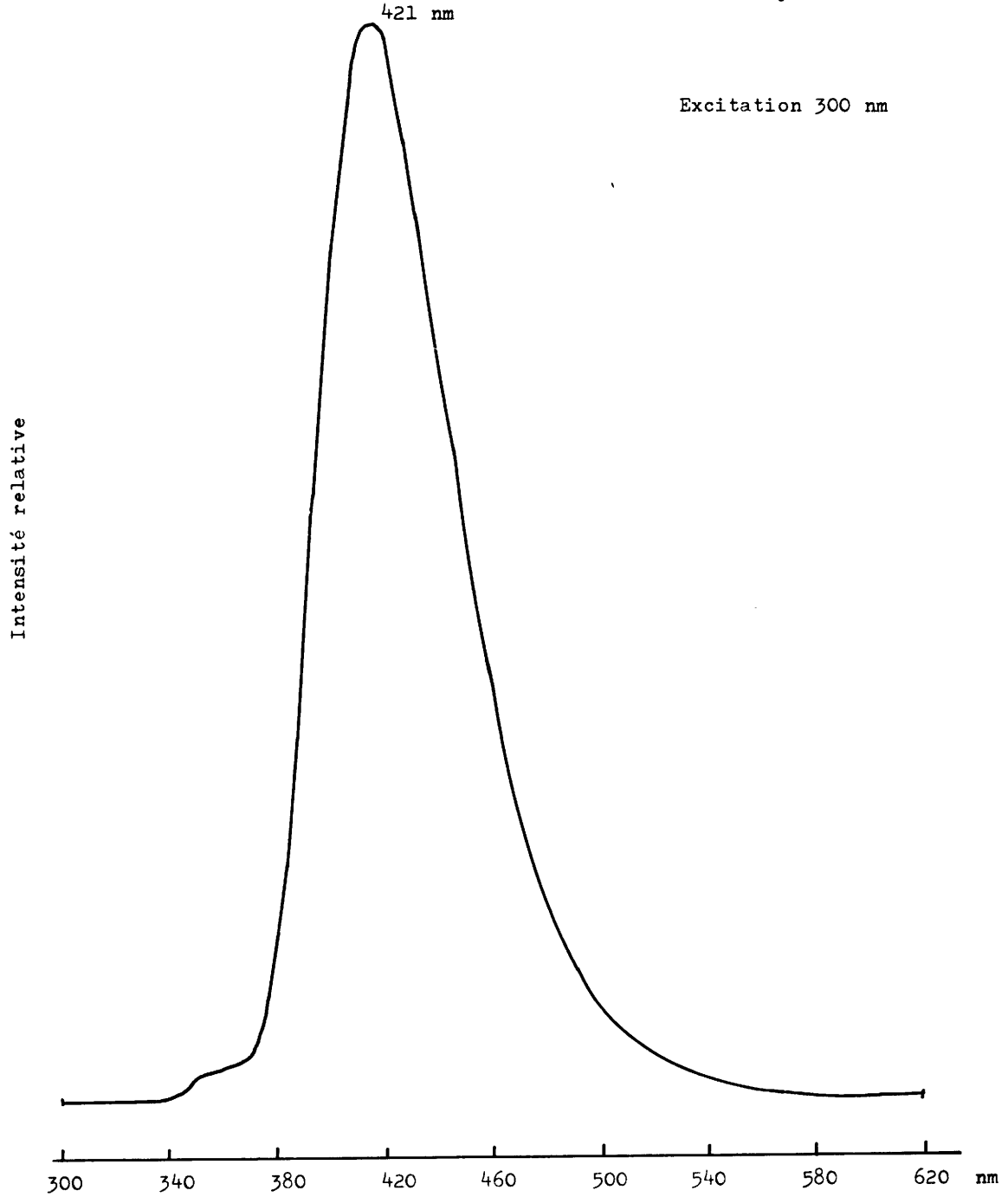
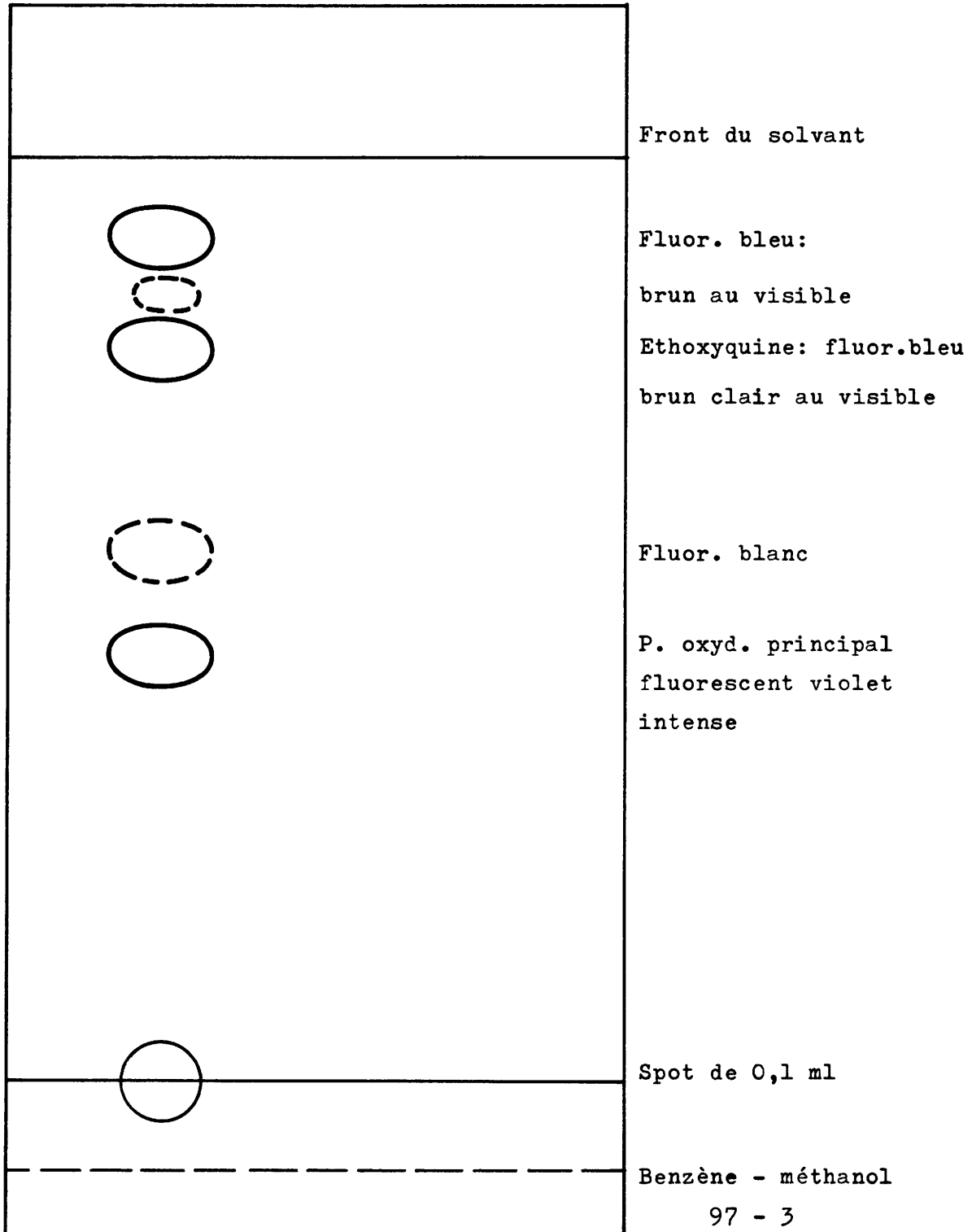


Fig. 2 Chromatographie sur couche mince d'une solution dans l'éther de pétrole de 200 mg d'éthoxyquine par litre



méthanol (97-3) ou un mélange éther de pétrole 60 - 80 - Acétone (75 - 25). Les plaques sont activées pendant une heure à 103°C; on dépose les spots, laisse les plaques se saturer de solvant pendant 20 minutes et on effectue une chromatographie ascendante sur 15 cm. L'examen des plaques est effectué sous la lumière d'une lampe U.V. émettant principalement dans la région de 360 nm.

Dans ces conditions, le R_f de l'éthoxyquine est de l'ordre de 0,78 avec le mélange benzène-méthanol et de 0,73 avec le mélange éther de pétrole-acétone.

Après séparation sur plaque, les solutions concentrées d'éthoxyquine (spots contenant 20 microgrammes) laissent apparaître au moins quatre spots, dont trois sont sans doute représentatifs de produits d'oxydation immédiats. Les R_f de ces spots sont approximativement de 0,90 (composé fluorescent bleu), 0,78 (éthoxyquine), 0,57 (composé fluorescent blanchâtre) et 0,45 (composé fluorescent bleu intense).

Le spot de l'éthoxyquine perd rapidement sa fluorescence bleue mais prend une teinte brun jaunâtre au visible et une fluorescence blanchâtre dès que la plaque est séchée, de sorte qu'il est souhaitable que l'examen soit immédiat. Aux faibles dilutions (inférieures à 5 microgrammes par spot), cet examen doit même être immédiat si on veut mettre en évidence l'éthoxyquine.

Le spot de R_f 0,90 perd également très rapidement ses propriétés de fluorescence.

Le spot fluorescent blanchâtre est peu caractéristique car la lumière émise est trop peu intense.

Il n'en va pas de même du spot de R_f : 0,45. Ce spot présente une fluorescence bleu violette permanente et relativement intense.

Si on dépose des solutions diluées d'éthoxyquine, ce spot présente une fluorescence violette parfois aussi intense que celle de l'éthoxyquine elle-même, mais qui a l'avantage d'être très stable.

2.3. Dosage et contrôle de l'éthoxyquine commerciale à 100% par spectrométrie U.V.

2.3.1. Dosage direct après mise en solution aqueuse acide

Cette méthode est décrite par Choy T. et col. dans J. Agric. Food Chem. II - 340 (1963).

On dissout une quantité déterminée d'éthoxyquine (env. 200 mg dans 100 cc éthanol). On utilise cette solution mère pour préparer des solutions connues d'éthoxyquine dans HCL 0,5 N - (10 à 100 mg/l).

Nous avons vérifié que le maximum d'absorption en U.V. se situe à 296 nm.

On recherche la concentration en éthoxyquine suivant la formule ci-dessous:

$$C \text{ éthox. en mg/litre} = \frac{E \text{ 296 nm} \times 10^4}{80,9}$$

Cette méthode a été appliquée au dosage de l'éthoxyquine dans un échantillon garanti pur à 100% gardé 6 mois en flacon métallique à environ 6°C et au dosage dans un échantillon d'éthoxyquine commerciale en fût à 100%.

Nous avons obtenu:

- 1) une concentration moyenne de 105% d'éthoxyquine pour l'échantillon en flacon métallique;
- 2) une concentration moyenne de 102% d'éthoxyquine pour l'échantillon commercial.

Ces résultats quelque peu élevés peuvent être expliqués, au moins en grande partie, par la formation de produits d'oxydation qui absorbent davantage de lumière dans l'U.V. que l'éthoxyquine pure.

Notons d'ailleurs qu'en appliquant une méthode de dosage par fluorimétrie, Gordon et col. (21) ont constaté que la teneur en éthoxyquine d'un échantillon conservé pendant un an dans un flacon en étain galvanisé se montait à 110%, sur la base d'une teneur de 100% pour un échantillon d'éthoxyquine fraîchement distillée.

2.3.2. Dosage indirect après extraction de l'éthoxyquine dans un solvant organique par des solutions aqueuses acides

On dissout une quantité déterminée (environ 200 mg) dans 200 cc d'éther de pétrole. On extrait 10 cc de cette solution mère (10 mg d'éthoxyquine) par 5 x 20 cc HCL 0,5 N et on ajuste au volume de 100 cc avec ce même HCL.

On établit le spectre d'absorption U.V. de 280 à 320 nm (fig. 3) et vérifie que le maximum d'absorption se situe à 296 nm.

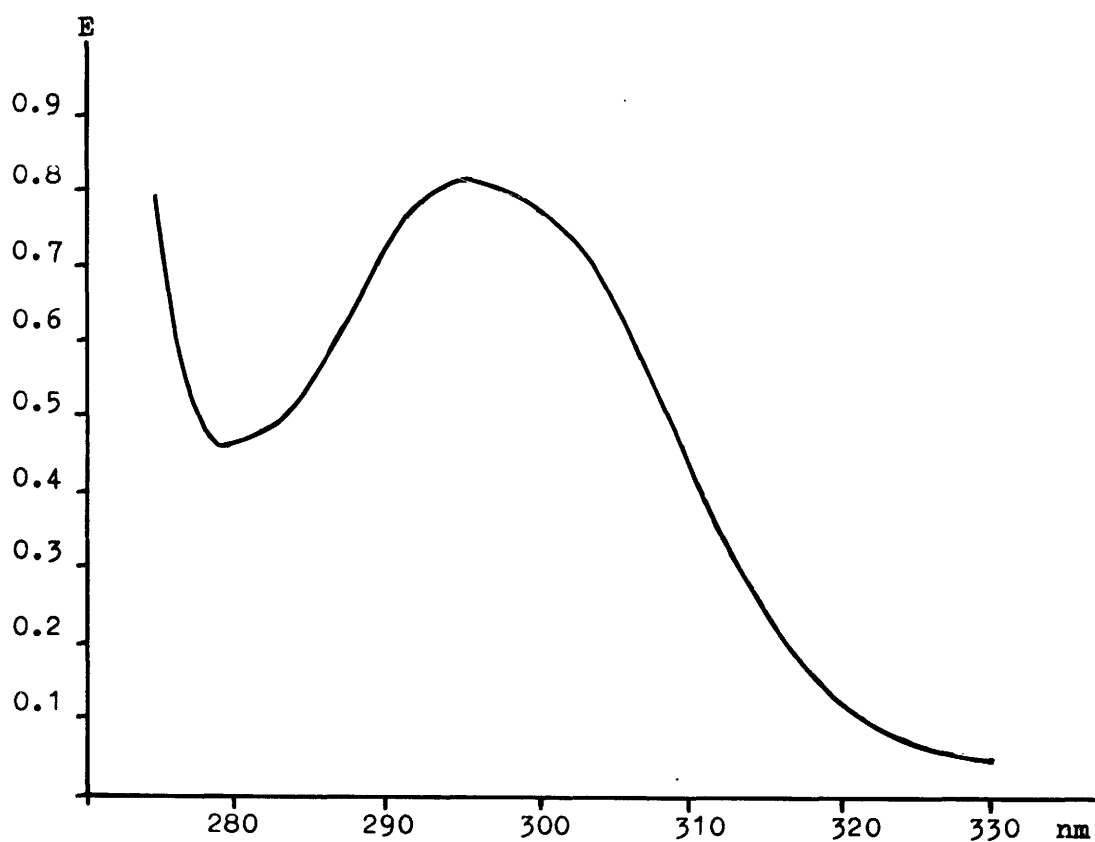
La concentration en éthoxyquine est calculée de la même façon que ci-dessus (chapitre 2.3.1.).

21. Gordon R.S., Pierron E.D., Kelle R.E. - Determination of Santoquin in feeds; Journal of the A.O.A.C. 44 - 3 - 560 (1961)

Nous avons obtenu:

- 1) une concentration moyenne de l'ordre de 99% pour l'échantillon en flacon métallique;
- 2) une concentration moyenne de l'ordre de 97,5% pour l'échantillon d'éthoxyquine commerciale à 100%.

Fig. 3 Spectre d'absorption U.V. d'un extrait de 10 ml d'éthoxyquine dans 100 cc HCl 0,5 N (10 mg/litre)



Il semble donc que dans l'éthoxyquine commerciale non fraîchement préparée, il existe des produits d'oxydation (cfr. chap. 2.2.) difficilement extractibles par HCl 0,5 N. Si on utilise HCl N, tel que le préconise Wolff (19) pour l'extraction de l'éthoxyquine des graisses, la teneur en produits fluorescents non extraits (examen en fluorimétrie) diminue considérablement (environ de moitié). Cette même teneur par contre ne diminue plus que très lentement si au lieu de HCl N, on utilise HCl 2N, et, de toute manière, l'extraction des produits fluorescents demeure toujours incomplète, même avec l'utilisation de solutions de HCl 5N.

3. Méthodes de dosage de l'éthoxyquine dans les corps gras

3.1. Spectrométrie U.V.

L'éthoxyquine peut être extraite des corps gras selon la méthode de Choy et col. (20) ou mieux suivant la méthode de Wolff (19) qui préconise l'extraction de 20 gr de graisse par 3 fois 20 cc HCl N (au lieu de HCl 0,5 N chez Choy) et ensuite de porter au volume de 100 cc par ce même HCl N. Nous avons constaté cependant que cette méthode était assez imprécise, particulièrement si le taux d'éthoxyquine dans la graisse est inférieur à 100 gr/tonne soit 100 mg/kg. Pour obtenir une précision suffisante, nous nous sommes aperçus qu'il était nécessaire que l'échantillon extrait contienne au minimum environ 3 à 4 mg d'éthoxyquine, ce qui rejoint les observations faites à ce sujet par Choy et col. (20). Cependant 3 à 4 mg d'éthoxyquine pour 20 g de graisse sont équivalents à 150 à 200 grammes/tonne.

Il faut signaler également que la présence de B.H.A. dans les graisses tracées rend la méthode inapplicable, si on ne la modifie pas quelque peu. En effet, le B.H.A. possède un spectre U.V. dont le maximum d'absorption se situe vers 290 nm et est partiellement extrait dans les conditions de la méthode. Si le B.H.A. est présent, Choy (20) préconise une extraction à l'éthanol et une saponification préalable des glycérides et du B.H.A. par une solution aqueuse concentrée de potasse. Cependant, la méthode devient beaucoup plus onéreuse.

Notons aussi que le saindoux et le suif, qui représentent ensemble au moins 49% de la graisse tracée suivant le règlement CEE 1732/69 sont souvent additionnés d'un antioxydant tel le B.H.T. ou le B.H.A.

Pour les besoins de notre étude, la méthode de dosage par spectrométrie U.V. a donc été jugée insuffisante. Nous utiliserons plus couramment la méthode de dosage par fluorimétrie qui, malgré ses défauts (fluorescence non stable dans le temps, légère fluorescence de certains composés présents dans le beurre) est de loin beaucoup plus sensible.

3.2. Fluorimétrie

3.2.1. Méthode et sensibilité

L'éthoxyquine se dose principalement par fluorimétrie. On utilise comme référence une solution diluée de sulfate de quinine dans H_2SO_4 0,1 N. Il faut disposer d'un fluorimètre équipé d'une lampe U.V. émettant princi-

palement dans la région du spectre voisine de 360 nm et muni d'un filtre primaire de 360 nm et d'un filtre secondaire laissant passer de 410 à 580 nm (non en dessous de 410 nm).

Nous avons utilisé un fluorimètre Turner modèle 110, équipé de filtres de 360 à 415 nm.

La fluorescence de solutions standard d'éthoxyquine dans l'éther de pétrole a été vérifiée périodiquement par comparaison avec la fluorescence de solutions de sulfate de quinine dans l'acide sulfurique 0,1 N.

A la lecture au fluorimètre de la fluorescence d'une solution de 1 mg/l de sulfate de quinine dans H_2SO_4 0,1 N correspond la lecture de la fluorescence d'une solution de 3,6 à 3,8 mg/l d'éthoxyquine dans l'éther de pétrole.

L'intensité de la lumière émise en fluorescence est approximativement proportionnelle à la concentration, pour de faibles dilutions d'éthoxyquine dans l'éther de pétrole, inférieures à 2 mg/l.

Les solutions standard ne peuvent être gardées que très peu de temps au frigo car on enregistre une diminution légère de la fluorescence, due sans doute à une destruction lente de l'éthoxyquine par oxydation.

La sensibilité de la fluorimétrie en tant que méthode de détermination de l'éthoxyquine est extrêmement grande; elle permet de se rendre compte de la présence de moins de 0,001 p. p. m. d'éthoxyquine.

En pratique, elle est cependant limitée par la fluorescence éventuelle des solvants et lors du dosage dans les graisses, par la faible fluorescence de certains constituants (caroténoïdes).

3.2.2. Dosage dans les corps gras

L'éthoxyquine étant présente dans les graisses dénaturées à des doses de l'ordre de 100 gr/tonne ou 100 mg/kg, et la sensibilité des fluorimètres permettant de mesurer facilement des concentrations de l'ordre de 0,1 mg/litre, nous avons procédé de la façon suivante: on dissout 1 gramme de graisse dans 100 ml éther de pétrole et on effectue une courbe de calibration à partir de solutions semblables de graisses contenant 150, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5 grammes d'éthoxyquine par tonne. On réglera le fluorimètre à 0 avec une solution contenant 1 gr de "butter oil" dans 100 cc d'éther de pétrole.

L'intensité de la lumière émise en fluorescence est approximativement proportionnelle à la concentration pour les solutions contenant 0,05 à 1,5 mg

d'éthoxyquine par litre.

Cependant, pour les faibles concentrations, le témoin peut introduire des erreurs non négligeables. En effet, les solutions de 1 gr de butter oil dans 100 cc d'éther de pétrole donnant par rapport au solvant pur, une fluorescence non négligeable et assez variable, la lecture au fluorimètre peut donner des chiffres comparables à ceux obtenus à partir d'une solution à 0,1 mg/l d'éthoxyquine dans l'éther de pétrole. Il faut donc s'abstenir de vouloir doser de cette manière moins de 10 grammes d'éthoxyquine par tonne de graisse, les interférences dues à la présence de produits naturels fluorescents présents dans les graisses étant alors trop élevées.

4. L'éthoxyquine employée en tant que traceur des corps gras

4.1. L'éthoxyquine traceur semi-immédiat

Le règlement CEE n° 1732/69 prévoit l'addition de 150 gr d'éthoxyquine dans certains mélanges de graisses, dont de la graisse butyrique, destinés à entrer dans la composition d'alimentation pour bétail.

Comme pour la chlorophylle, nous avons réalisé des mélanges de graisses (30% saindoux, 30% de graisse de boeuf, 40% graisse butyrique) contenant des concentrations croissantes en éthoxyquine, soit 0 - 2 - 5 - 7,5 - 10 - 20 - 30 - 50 - 75 - 100 - 125 - 150 grammes/tonne.

Ces échantillons ont été examinés sous la lumière d'une lampe U.V. émettant principalement dans la région de 360 nm.

L'examen direct à la lampe U.V. des graisses tracées, laisse apparaître d'une manière indiscutable la fluorescence bleue pour un échantillon contenant 7,5 gr d'éthoxyquine/tonne. A la dose de 5 grammes/tonne, la fluorescence est déjà perceptible, ce qui permet de se douter d'une anomalie quelconque; on confirmera dans ce cas la présence du traceur éthoxyquine par une analyse complémentaire. A la dose de 2 grammes/tonne, la faible fluorescence qui pourrait être perceptible peut être due à des traces de produits qui possèdent une certaine fluorescence, tels les caroténoïdes, et ne peut donc être imputée nécessairement à l'éthoxyquine.

On peut donc facilement, grâce à l'utilisation d'une simple lampe U.V., dont disposent tous les laboratoires, mettre en évidence environ 5% de beurre dénaturé réglementaire (150 grammes par tonne) dans un beurre normal.

Nous concluons donc que l'éthoxyquine incorporée dans les corps gras à la dose prescrite par le règlement communautaire, peut être considérée comme un traceur visuel semi-immédiat pour la mise en évidence de ces corps gras. Nous considérons même que la dose prescrite de 150 gr/tonne qui est une dose limite admise par la F.D.A. pour les fourrages déshydratés, pourrait être ramenée sans inconvénient à une dose de 100 gr/tonne s'il n'existait pas de méthodes faciles de réduction de ce taux par extraction de l'éthoxyquine avec des solutions aqueuses acides.

4.2. L'éthoxyquine, traceur analytique

L'éthoxyquine est un très bon traceur analytique. En effet, la méthode de dosage par fluorimétrie exposée au chapitre 3.2.2. est extrêmement sensible quoique limitée à des concentrations d'environ 10 à 15 grammes/tonne de graisse.

En outre, l'éthoxyquine étant pour une grande partie extraite par le méthanol, l'extrait méthanolique peut être concentré et examiné en chromatographie sur couche mince. Au cours de la concentration, l'éthoxyquine est en partie oxydée, mais les produits d'oxydation sont encore plus facilement décelables par fluorescence, sur couche mince que l'éthoxyquine elle-même (voir chapitre 6.2.).

5. Dégradation de l'éthoxyquine dans les matières grasses

5.1. Action de la chaleur et de l'oxydation

L'éthoxyquine étant un antioxydant, sa concentration dans les matières grasses diminuera au fur et à mesure qu'elle pourra exercer sa fonction réductrice. Pour la détruire, il suffirait de la mettre en contact avec un oxydant énergétique pendant une période très brève (H_2O_2 par ex.), ou simplement de l'exposer à l'air et à la chaleur pendant une période plus longue (quelques jours).

Il n'est pas possible d'utiliser un oxydant énergétique au sein des matières grasses; car celles-ci seraient elles-mêmes oxydées et rendues impropres à la consommation ou à la commercialisation.

R.S. Gordon et col (21) ont d'ailleurs constaté qu'une teneur initiale d'éthoxyquine de 130 mg/tonne dans les aliments pour volailles ne présentait pas une diminution sensible, après cinq semaines de conservation à une température de 25°C.

A 55°C, la teneur diminue rapidement dès la deuxième semaine pour tendre vers 0 la 8e semaine.

Nous nous sommes donc limités à étudier l'action de l'oxydation naturelle à chaud sur la teneur en éthoxyquine des corps gras tracés.

Nos expériences ont porté sur des échantillons de 10 grammes de graisses placés en tubes ouverts et en tubes fermés par un bouchon rodé, d'une capacité de 40 ml. La graisse était tracée à la dose de 150 gr d'éthoxyquine à la tonne et les tubes ont été mis à l'étuve à 70°C et à 100°C pendant plusieurs jours.

La disparition progressive de l'éthoxyquine a été mesurée au fluorimètre et par chromatographie sur couche mince suivant une technique développée au chapitre 2.2.

La diminution du taux d'éthoxyquine enregistrée par fluorimétrie est surtout importante les deux premiers jours. Le taux tombe à environ 100 grammes/tonne dès après conservation des échantillons en tubes fermés ou ouverts pendant un jour à une température de 70°C.

A une température de 100°C en tube ouvert, le taux d'éthoxyquine décroît plus rapidement et atteint après un jour, environ 65 grammes/tonne. En tube fermé, il reste de l'ordre de 80 gr/tonne.

Après deux jours à 70°C en tube ouvert, le taux tombe à 35 gr/tonne et à 100°C, environ à 25 grammes/tonne. En tube fermé, la diminution est à peine perceptible.

Après trois jours en tube ouvert, la réponse du fluorimètre donne un taux résiduaire d'environ 15 grammes/tonnes aussi bien à la température de 70°C qu'à la température de 100°C. La lecture sur le fluorimètre ne variera d'ailleurs plus guère au delà du 3e jour, ce qui laisse supposer que l'éthoxyquine étant détruite, il demeure dans la graisse des produits d'oxydation qui continuent à posséder une certaine fluorescence.

En tube fermé (rodage étanche), nous avons pu constater qu'après deux semaines de conservation à 100°C, la lecture au fluorimètre donnait encore une teneur d'environ 30 à 40 gr d'éthoxyquine/tonne.

Ceci indique que l'éthoxyquine est peu sensible à la chaleur, mais surtout sensible à l'oxydation. La dégradation de l'éthoxyquine s'arrête ou se ralentit très fort dès que la concentration en oxydant du milieu tend à s'annuler.

L'éthoxyquine, en faible concentration dans une graisse, sera évidemment susceptible d'être détruite beaucoup plus rapidement que l'éthoxyquine

en concentration plus élevée, puisque la teneur en oxydants de la graisse, reste en principe, pratiquement constante.

Etant détruite assez facilement dans les graisses par simple chauffage à l'air libre, l'éthoxyquine pourrait être considérée à première vue comme un mauvais traceur, puisque facilement et économiquement éliminable.

Ce n'est cependant pas le cas, car il faut tenir compte de la possibilité réelle de mettre en évidence certains produits d'oxydation, là même où l'éthoxyquine a complètement disparu.

Bon nombre de ces produits d'oxydation continuent à être fluorescents certains émettant à des longueurs d'onde simplement légèrement différentes, une fluorescence d'intensité supérieure à celle émise par l'éthoxyquine elle-même. Ces produits d'oxydation sont plus solubles dans les solvants polaires que dans l'éther de pétrole; c'est pourquoi, les méthodes officielles d'extraction de l'éthoxyquine et de ses dérivés dans les aliments, préconisent souvent l'emploi du méthanol afin d'obtenir une extraction plus complète (22).

6. Tests de mise en évidence de l'éthoxyquine ou de ses dérivés

6.1. Mesure de la fluorescence dans le méthanol

Sachant que les produits d'oxydation de l'éthoxyquine sont plus solubles dans le méthanol que dans l'éther de pétrole, on extrait une quantité déterminée de graisse par une quantité déterminée de méthanol; nous avons procédé de la manière suivante: 10 grammes de graisse sont extraits vers 50°C par deux fois 5 ml de méthanol.

Après la première extraction, la graisse est figée à 0°C et le méthanol surnageant est filtré et recueilli dans un tube à essai. La graisse est alors réchauffée à 50°C et on procède aux mêmes opérations.

L'extraction dépasse 80%. Les filtrats sont rassemblés et peuvent être examinés directement sous une lampe U.V. avec comme référence, une solution témoin préparée à partir d'un beurre pur.

Des échantillons frais de beurres tracés par 150 grammes d'éthoxyquine/tonne et les mêmes échantillons chauffés trois jours à l'air libre à 100°C (éthoxyquine pratiquement disparue) ont été examinés.

Les extraits méthanoliques de beurres chauffés présentaient encore une fluorescence notable.

Les spectres de fluorescence de ces extraits dans le méthanol ont été me-

surés (fig. 4).

On constate que dans le méthanol, le spectre de fluorescence de l'éthoxyquine non oxydée présente sa valeur maximum vers 446 nm, tandis que le spectre de fluorescence des produits d'oxydation obtenus par oxydation naturelle lente de l'éthoxyquine, possède sa valeur maximum vers 424 nm.

6.2. Chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques d'éthoxyquine

La fluorescence des graisses tracées ne disparaît que très lentement au cours d'un chauffage prolongé; cependant, les beurres chauffés dans les mêmes conditions voient se développer une certaine fluorescence, de sorte que l'examen visuel seul peut être difficilement un test de la présence du traceur, dans le cas où les graisses ont subi un chauffage prolongé.

Ce test sera établi par la chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques, suivant la technique décrite au chapitre 2.2.

On constate en effet que la disparition de l'éthoxyquine ($rf = 0,78$) dans les extraits méthanoliques va de pair avec une augmentation du produit d'oxydation principal ($rf = 0,45$) et certains produits secondaires.

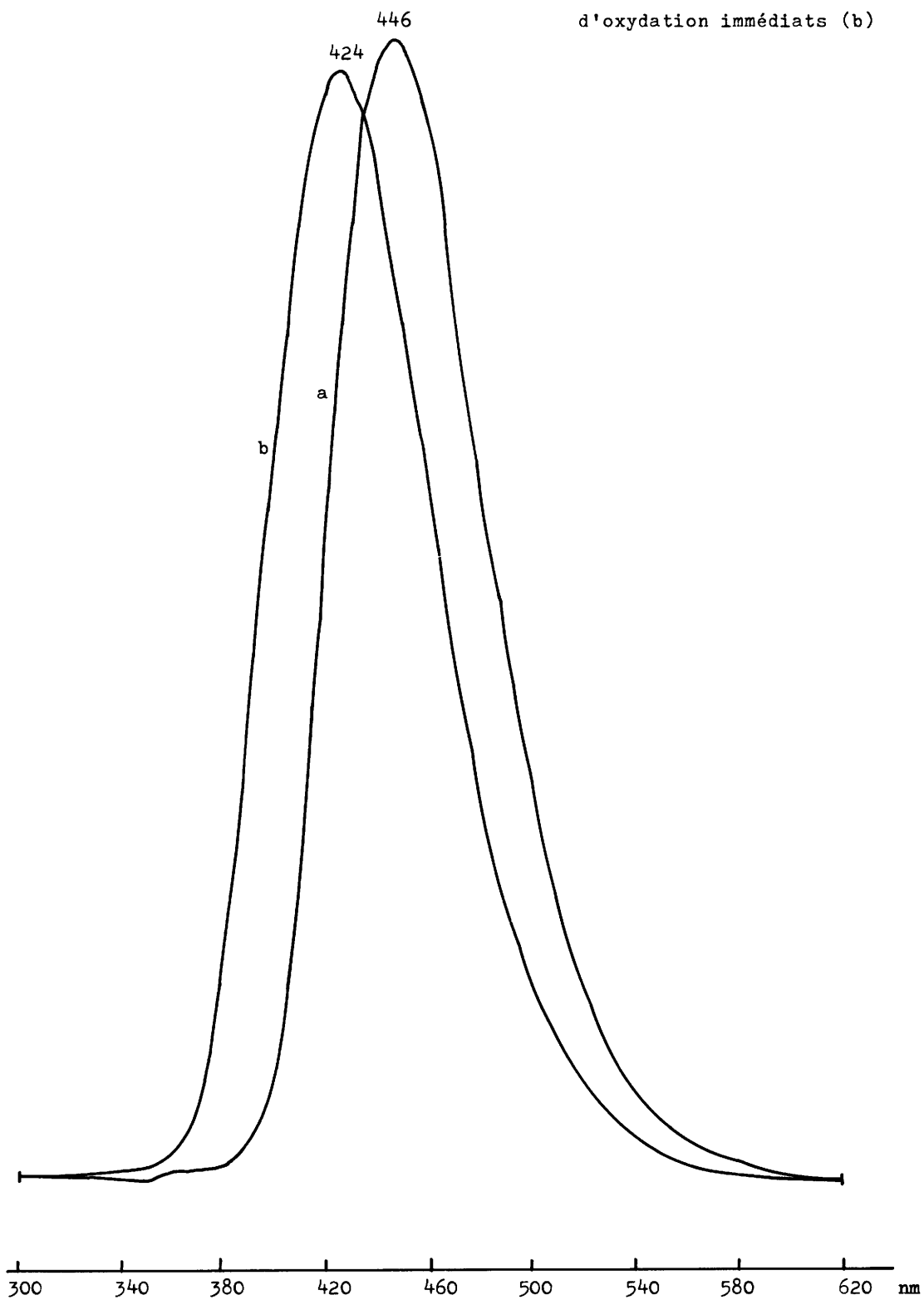
Or, le produit d'oxydation de $rf = 0,45$ possède une fluorescence bleue intense permanente et on le met en évidence bien plus facilement que l'éthoxyquine.

Si on dépose des spots de 0,1ml d'extraits méthanoliques de graisses chauffées 24 h à 100°C, on peut mettre facilement en évidence le produit d'oxydation de $rf 0,45$, à partir d'un extrait de graisses contenant seulement au départ 4 gr d'éthoxyquine/tonne.

En concentrant l'extrait méthanolique de 10 à 2 cc ou en déposant des spots sous forme de traits de 0,2 à 0,5 ml, on peut facilement mettre en évidence ce produit d'oxydation dérivé de l'éthoxyquine, si les extraits méthanoliques sont effectués à partir de graisses contenant au départ seulement 1 gramme d'éthoxyquine/tonne.

Il est d'ailleurs moins facile de mettre en évidence la présence d'éthoxyquine elle-même, celle-ci se dégradant assez vite à ces faibles concentrations et le principal produit de dégradation étant sans doute ce produit d'oxydation nettement mieux perceptible grâce à sa fluorescence permanente. L'éthoxyquine possède un bon pouvoir traceur, puisqu'on peut mettre en évidence par un test simple, moins de 1% de graisse tracée réglementaire (150 gr/tonne) dans un beurre normal, et peu importe ici que ce soit elle-même ou un de ses dérivés qui soient facilement décelables.

Fig. 4 Spectre de fluorescence d'extraits
méthanoliques (env. 150 mg/l)
d'éthoxyquine (a) et de ses produits
d'oxydation immédiats (b)



7. Techniques d'élimination de l'éthoxyquine des corps gras

7.1. Action de la vapeur et du vide à haute température ("stripping")

Nous avons réalisé en laboratoire le "stripping" de plusieurs échantillons de graisses tracées à raison de 150 gr d'éthoxyquine/tonne.

Les modalités opératoires du "stripping" étaient les suivantes:

Echantillons: env. 250 gr

Température: 190 - 200°C

Pression: env. 1 mm Hg

Vapeur: 15 ml/heure

Durée: 1 à 2 heures.

Le "stripping" a enlevé 70 à 95% de la fluorescence totale (lecture au fluorimètre) ou de 70 à 100% de l'éthoxyquine totale, si on considère que pour un échantillon on n'a plus pu mettre en évidence la présence d'éthoxyquine elle-même. Une partie de cette éthoxyquine fut d'ailleurs retrouvée dans la trappe; ceci n'est pas étonnant, l'éthoxyquine étant volatile dans les conditions réalisées par le "stripping".

Cependant, les extraits méthanoliques des graisses "strippées" comme des graisses chauffées, continuent à posséder une certaine fluorescence et par chromatographie sur couche mince de Kieselgel (chapitre 2.2.) on peut séparer et mettre en évidence les produits d'oxydation de l'éthoxyquine, qui possèdent une fluorescence intense et permanente.

Le produit d'oxydation principal ($rf = 0,45$) a été enlevé par grattage avec le Kieselgel, et on a tenté de le dissoudre dans l'iso-octane.

La solubilité est très faible et la solution présente son maximum de fluorescence vers 410 nm. Dans le méthanol, la solubilité est au contraire très bonne et le maximum de fluorescence s'observe vers 424 nm.

La disparition de l'éthoxyquine dans les beurres chauffés ou "strippés" s'accompagne également sur les chromatogrammes de l'apparition de quelques produits fluorescents de rf variable.

Outre le produit principal déjà cité ($rf = 0,45$), nous noterons principalement un produit de rf voisin de 0,85, très légèrement supérieur à celui de l'éthoxyquine, dont la fluorescence bleue est assez stable et qui apparaît toujours après chauffage ^{prolongé} de la graisse, lorsque les concentrations en éthoxyquine ne sont pas négligeables (supérieures à 25 gr/tonne).

7.2. Lavage des corps gras par des solutions aqueuses acides

Nous avons vu aux chapitres 1 et 2, que l'éthoxyquine à cause de sa basicité, était facilement extractible des corps gras par simple lavage par des solutions aqueuses acides. En principe, plus l'acidité de la solution aqueuse est élevée, plus l'extraction est complète, et il y a lieu ici d'employer une solution aqueuse acide normale, plutôt que demi-normale. Nous savons aussi que, après lavage d'un corps gras par 3 fois son volume d'acide chlorhydrique normal ou demi-normal, l'extraction des produits fluorescents n'est pas complète, encore qu'on puisse considérer l'extraction de l'éthoxyquine en tant que telle comme pratiquement complète. La fluorescence de graisses contenant 150 gr d'éthoxyquine/tonne, extraites de cette manière, puis lavées deux fois par leur volume d'eau est cependant très faible et n'est plus directement visible sous une lampe U.V. Elle est donc inférieure à la fluorescence émise par une graisse contenant 7,5 gr d'éthoxyquine/tonne et le dosage par fluorimétrie suivant la technique exposée au chapitre 3.2. devient tout à fait précaire, en raison de la fluorescence pouvant être émise par des composés présents dans les corps gras.

En vue de la recherche de traces d'éthoxyquine ou de ses dérivés dans les corps gras, on doit obligatoirement passer par une extraction de ceux-ci en milieu alcoolique.

20 grammes de graisse tracée à raison de 150 gr d'éthoxyquine/tonne sont dissous dans 20 ml d'éther de pétrole et extraits par 3 fois 20 ml d'HCl N. On lave par 2 fois 20 ml d'eau distillée, recueille la solution grasse, évapore le solvant au B-M; la graisse est alors extraite à 50°C par 2 fois 10 ml de méthanol. On réunit les extraits méthanoliques et procède à la chromatographie sur couche mince suivant la méthode habituelle.

Si on dépose un spot de 0,1 ml, aucun composé fluorescent ne se distingue nettement après développement, ce qui signifie que le reliquat de pouvoir traceur est inférieur à celui que donnerait une graisse contenant 4 gr d'éthoxyquine/tonne ou encore inférieur à 3% du pouvoir traceur initial. Si on concentre à sec l'extrait au méthanol, reprend l'extrait sec par 2 ml de méthanol et dépose 0,1 ml de celui-ci sur une plaque de chromatographie en couche mince, après développement, on constate l'apparition d'un spot fluorescent nettement visible de $rf = 0,45$ et aussi l'apparition d'un spot moins net de rf de 0,85.

Par contre, on ne peut mettre en évidence de spot au rf de l'éthoxyquine.

Une expérience similaire a été effectuée en utilisant cette fois HCl 2N, en procédant à 5 lavages acides et à 3 lavages à l'eau.

L'extrait méthanolique a été effectué puis concentré de la même manière que ci-dessus.

La présence du produit d'oxydation de $rf = 0,45$ a encore pu être mise en évidence.

Ceci nous confirme nos observations précédentes (chapitre 2.3.2.) suivant lesquelles, si l'éthoxyquine peut théoriquement être totalement enlevée de la matière grasse par lavage avec des solutions aqueuses acides, certains produits, dérivés de celle-ci et gardant une fluorescence appréciable ne sont pas complètement extractibles.

En réalité, ce n'est pas l'éthoxyquine qui est décelée, mais certains de ces produits de dégradation.

La sensibilité du test est extrêmement grande et peut être théoriquement poussée à l'infini, puisque il suffit d'extraire au méthanol des échantillons suffisamment importants et de concentrer le plus possible les extraits méthanoliques. Il permet certainement de mettre en évidence dans une matière grasse une quantité de produits dérivés de l'éthoxyquine qui posséderaient le même pouvoir fluorescent que 0,1 gr d'éthoxyquine/tonne.

L'emploi de solutions normales d'HCl pour laver les corps gras ne pose guère de problème en industrie.

Il faut cependant procéder à chaud, pour liquéfier la matière grasse ou dissoudre celle-ci dans un solvant. A chaud, les pertes en acides gras et glycérides hydrolysés seront plus importantes qu'en utilisant un solvant. Il sera de toute façon nécessaire de procéder après le lavage aux acides et le rinçage à l'eau, à un certain raffinage ou à une désodorisation du corps gras, afin d'éliminer l'excès d'acides libres et les peroxydes qui se sont développés au cours du traitement acide.

L'extraction de la plus grande partie de l'éthoxyquine des graisses peut donc être réalisée avec un équipement relativement simple, disponible en laiterie (cuves, écrémeuses, désodorisateurs).

Le pouvoir traceur semi-immédiat (fluorescence des graisses sous une lampe U.V.) peut certainement être complètement annihilé de cette manière, mais il est pratiquement impossible de réduire à néant le pouvoir traceur analytique, l'éthoxyquine commerciale étant toujours accompagnée de produits d'oxydation non entièrement extractibles par les solutions acides, ceux-ci pouvant d'ailleurs se développer au cours des traitements industriels des corps gras.

7.3. Elimination de l'éthoxyquine et des dérivés des chlorophylles au cours des opérations industrielles conduisant à la fabrication d'aliments pour bétail

La graisse tracée suivant le règlement communautaire n° 1732/69 (150 gr d'éthoxyquine et 8 gr de chlorophylle/tonne) est utilisée dans la préparation de mélanges alimentaires pour bétail.

Elle est dispersée le plus souvent dans du lait écrémé, lequel est transformé en poudre suivant un procédé "spray". Il apparait que ce traitement n'affecte pas le taux en éthoxyquine de la graisse tracée (de 0 à 15% de diminution maximum). La poudre obtenue présente, sous une lampe U.V. émettant principalement dans la région de 360 nm, une fluorescence bleue intense. Au contraire, la présence de phéophytines (taux réglementaire de 8 gr/tonne) ne peut être mise en évidence de façon formelle.

8. Conclusions

8.1. L'emploi de l'éthoxyquine en tant que traceur de la matière grasse butyrique

L'éthoxyquine, à notre avis, constitue un bon traceur des corps gras sans être un excellent traceur.

C'est un bon traceur, car sa fluorescence est perceptible à des doses infimes dans les corps gras et qu'elle peut être mise en évidence quasi directement si on dispose d'une simple lampe U.V.

Ce n'est pas un excellent traceur, car elle est éliminable dans sa quasi totalité par des techniques très simples ("stripping" et principalement extraction en milieu acide).

Elle reste quand même un traceur valable, car l'élimination de ses produits de dégradation au sein des corps gras est pratiquement impossible et parce que le test de mise en évidence de l'éthoxyquine ou de ses dérivés par extraction au méthanol et chromatographie sur couche mince est relativement simple.

A défaut d'un meilleur traceur, il est souhaitable que la CEE la maintienne comme révélateur des graisses dénaturées à destination de l'alimentation animale, à une dose d'environ 150 gr/tonne.

8.2. L'emploi simultané des dérivés des chlorophylles et de l'éthoxyquine en tant que traceur de la matière grasse butyrique

L'éthoxyquine est un traceur visuel des corps gras uniquement dans les cas où ceux-ci sont exposés à la lumière d'une lampe U.V. (traceur visuel semi-immédiat). En lumière naturelle par contre, elle ne gênera en aucune façon la détermination visuelle de traceurs comme les dérivés des chlorophylles. Les zones d'émission de fluorescence de l'éthoxyquine et des dérivés des chlorophylles magnésiennes ne se recouvrent pas.

Au moyen de filtres appropriés, il sera donc également possible de doser les 2 traceurs par fluorimétrie.

Cependant, nous avons vu au chapitre traitant des chlorophylles, tous les aléas que pouvaient présenter le dosage par fluorimétrie de ces produits; nous savons également que les chlorophylles cuivriques les plus sensibles en tant que traceurs visuels, ne sont pas fluorescentes.

D'autre part, l'intensité de la fluorescence émise dans le bleu par l'éthoxyquine est de loin supérieure à celle émise dans le rouge par des taux comparables de phéophytines, de sorte que pour l'oeil, cette dernière n'est pas perceptible.

Etant donné ces observations, nous considérons que l'emploi des chlorophylles ou de leurs dérivés, coûteux et nécessitant une législation à revoir et mettre au point, est inefficace et inutile. En effet, la fluorescence due à l'éthoxyquine est actuellement suffisante pour déceler, à l'aide d'une simple lampe U.V., l'addition de moins de 5% d'un corps gras tracé réglementaire (150 gr d'éthoxyquine/tonne) dans un beurre normal.

Cette sensibilité de détection n'est même pas permise, et de loin, analytiquement, par l'addition de chlorophylle à la dose réglementaire CEE de 8 grammes/tonne.

Une dénaturation d'un corps gras permettant de se rendre compte visuellement de la présence de 5% de graisse dénaturée dans un beurre normal coûterait 24 à 32 U.C./tonne, par l'emploi de chlorophylle commerciale, alors que cet effet est obtenu d'une manière indirecte, mais visuellement par fluorescence, par l'emploi d'éthoxyquine pour un prix de 0,27 U.C./tonne, soit environ 100 fois moindre.

D'autre part, les chlorophylles et leurs dérivés, sont totalement éliminables des corps gras par filtration sur charbon actif, tandis que les dérivés de l'éthoxyquine ne sont pas totalement éliminables des corps gras par "stripping" ou extraction par des solutions aqueuses acides.

On peut dépister ces produits dérivés de l'éthoxyquine, même si la graisse dénaturée à raison de 150 gr d'éthoxyquine par tonne et lavée aux solutions acides est diluée dans un beurre normal avec une dilution très grande de l'ordre de 1%. On décèle même des traces (environ 0,1%), si on extrait par le méthanol les dérivés de l'éthoxyquine d'un échantillon suffisamment grand (30 à 50 gr), si on concentre suffisamment cet extrait (jusqu'à 0,5ml au moins) et enfin si on met en évidence les produits dérivés de l'éthoxyquine par chromatographie sur couche mince.

VI. LES TRIGLYCERIDES NATURELS

Note préalable: choix des traceurs

De nos travaux précédents (chapitres I à V), il est apparu que le choix d'un traceur efficace de la matière grasse butyrique (sensible, non toxique, non économiquement éliminable) est un problème difficile concernant la chimie des corps gras. On bute principalement sur les deux exigences requises ci-dessous:

- 1) Le traceur doit être admis par les services qui ont dans leurs attributions les problèmes relatifs à la santé publique, dans les divers états membres de la CEE;
- 2) Le traceur doit être non économiquement éliminable de la matière grasse butyrique, compte tenu de la différence énorme qui existe entre les prix mondiaux et les prix pratiqués pour le beurre dans les pays de la CEE.

La première exigence nous interdit pratiquement de faire notre choix parmi les substances de synthèse, si celles-ci ne correspondent pas à des produits naturels ou si leur innocuité biologique n'est pas démontrée.

La seconde exigence rend très difficile le choix d'une substance dont les propriétés chimiques et physiques sont très différentes de celles de tout ou partie de la matière grasse.

On sait particulièrement que les procédés modernes de désodorisation des corps gras, entre autres le "stripping", peuvent éliminer assez facilement toutes les substances dont le point d'ébullition à température ordinaire atteint jusqu'à 300°C: ce sont d'ailleurs les possibilités d'élimination par "stripping" qui constituent le handicap majeur de traceurs comme le sésamol et la vanilline.

Le "stripping" pourrait également donner lieu à l'élimination de certains anti-oxydants, tel le BHA ou le BHT et bien entendu des acides gras libres.

D'autres part, si le traceur a un caractère acide ou alcalin, ou s'il a une polarité suffisante, on pourra l'éliminer par des solvants aqueux.

Nous sommes donc presque impérativement poussés à rechercher un traceur valable parmi les constituants de la matière grasse elle-même.

Rappelons ici que les bêta et gamma sitostérols (24 b et a cholestérol) sont de très bons traceurs de la matière grasse butyrique aussi bien d'ailleurs que de la plupart des matières grasses animales (chapitre III).

Disposant d'un traceur valable pour la matière grasse butyrique, parmi les stérols

de l'insaponifiable des corps gras, ne pourrait-on disposer également d'un traceur valable parmi les acides gras des glycérides?

La réponse à cette question nous a conduit logiquement à tester premièrement deux substances actuellement commercialement disponibles, à savoir le miglyol 812, tri-glycérides d'acides moyens fournis par une firme allemande, et l'huile de colza.

VI 1. LE MIGLYOL 812

1. Composition et propriétés générales

Le miglyol 812 est commercialisé par la firme allemande "Dynamit Nobel" à Witten (Ruhr), qui en détient le brevet de fabrication. Celle-ci signale qu'il s'agit d'une huile composée de triglycérides d'acides à chaîne moyenne.

Comme acides gras, le miglyol 812 contient principalement de l'acide caprylique (C8) (ca 60%), de l'acide caprique (C10) (ca 35 - 45%), de l'acide laurique (C12) (max. 5%) et de l'acide caproïque (C6) (max. 3%).

Le miglyol 812 est préparé à partir de matières grasses naturelles par divers processus physiques (distillation). Il est utilisé principalement en tant que matière première dans la confection des graisses ou des produits diététiques et des margarines et, de même, dans le traitement superficiel des raisins secs. Son prix est de l'ordre de 1,6 à 1,8 U.C. le kg et les quantités nécessaires à la dénaturation des excédents de beurre de la CEE pourraient être rapidement disponibles.

Le pouvoir traceur du miglyol sera basé principalement sur son taux élevé d'acide caprylique et accessoirement sur son taux élevé d'acide caprique.

Il faut noter ici que la "Dynamit Nobel" commercialise également une huile de composition voisine de celle du miglyol 812, le miglyol 810, contenant environ 75% d'acide caprylique (C8) et 20% d'acide caprique (C10).

Malheureusement, le miglyol 810 est considérablement plus coûteux que le miglyol 812 et surtout n'est pas commercialement disponibles en grande quantité, de telle sorte qu'avant toute analyse, on peut penser qu'il pourra difficilement être retenu comme traceur valable.

2. Le miglyol 812 en tant que traceur de la matière grasse butyrique

2.1. Dose de traceur

La dose de traceur à introduire dans la matière grasse butyrique pour que la dénaturation soit efficace, c'est à dire puisse être observée lors de dilutions importantes de beurres tracés dans un beurre normal, dépend évidemment du seuil de sensibilité que l'on veut atteindre.

Cependant, pratiquement et économiquement, cette dose de traceur doit être minime et nous estimons qu'elle ne peut dépasser 4 à 5%, ce dernier chiffre nous paraissant déjà excessif.

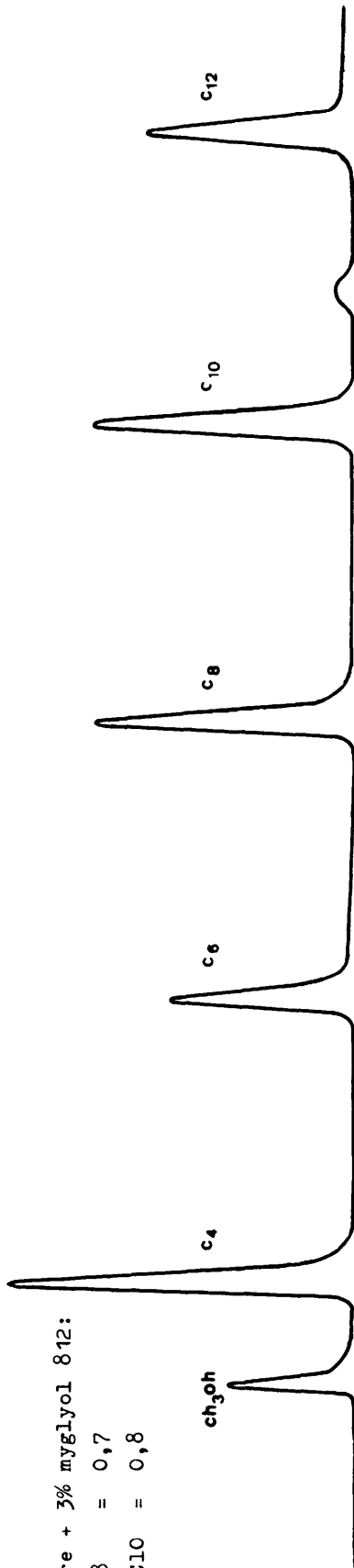
Le dépistage du traceur sera basé uniquement sur la détermination du taux des acides gras par chromatographie gazeuse de leurs esters méthyliques.

Dénaturation du beurre par le myglycol 812 (58% C8, 40% C10)
Acides inférieurs Col. ac. inox. 2 m x 3 mm 18% DEGS sur chrom. W 60 - 80

1. Beurre + 3% myglycol 812:

C6/C8 = 0,7

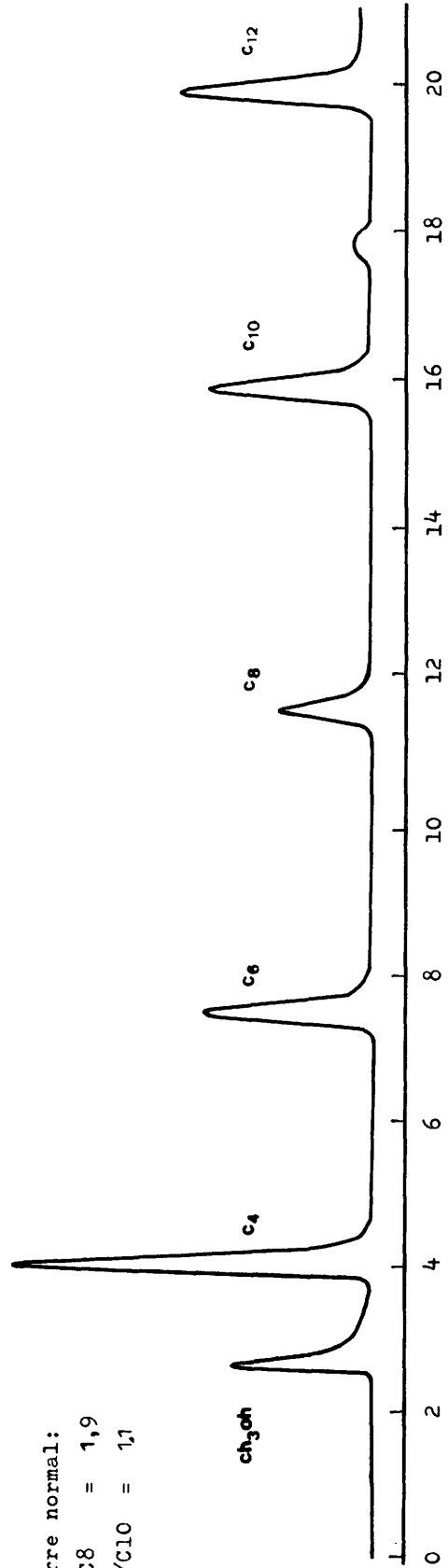
C12/C10 = 0,8



2. Beurre normal:

C6/C8 = 1,9

C12/C10 = 1,1



Les techniques de chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides gras sont maintenant suffisamment au point dans tous les laboratoires d'analyse des corps gras pour qu'on s'y attarde encore. Comme les acides intéressants sont à chaîne relativement courte, nous signalons simplement qu'il est intéressant de travailler à température peu élevée ou mieux en programmation de température.

L'anomalie qu'on observera dans la composition d'un beurre tracé par une quantité suffisante de miglyol résidera davantage dans les variations non naturelles du rapport des acides C6/C8 et même C12/C10, plutôt que dans une augmentation du taux des acides capryliques (C8) et caprique (C10). Nous savons en effet que les taux des acides gras du beurre varient largement suivant de nombreux facteurs, tels la race, l'individu, la période de lactation, le régime alimentaire, celui-ci constituant généralement le facteur le plus important.

Cependant, ce facteur "régime alimentaire" n'intervient que globalement pour les acides inférieurs C4, C6, C8 et même C10, ceux-ci n'étant pas ou n'étant que très peu représentés dans n'importe quel régime alimentaire. Ainsi, le rapport C6/C8 de la matière grasse butyrique varie peu et est de l'ordre de 1,6 à 2. Exceptionnellement, il descend sous 1,5 ou dépasse 2. Le taux de C8 par contre peut passer facilement du simple au double (0,8 à 1,8%) et est en moyenne de 1,2%.

Si on considère un beurre de composition moyenne en acides gras inférieurs, soit 3,6% d'acide butyrique (C4), 2,1% d'acide caproïque (C6), 1,2% d'acide caprylique (C8), quels seront les effets d'une addition de 2, 3, 4% de miglyol 812? De la réponse à cette question dépend la sensibilité du miglyol en tant que traceur, donc son efficacité et sa valeur.

2.2. Sensibilité du traceur

Cette sensibilité a été étudiée expérimentalement, suivant le schéma d'expérience ci-dessus, mais elle peut être également vérifiée théoriquement.

Notons tout d'abord que l'échantillon de miglyol qui nous a été soumis avait la composition en acides gras suivante (composition déterminée par chromatographie gazeuse):

C6	:	Ca	1%
C8	:	Ca	58%
C10	:	Ca	40%
C12	:	Ca	1%

Cette composition est pratiquement identique à celle donnée par la firme productrice.

Si on ajoute 2, 3, 4% de miglyol à un beurre de composition moyenne (chapitre 1.2.1.), nous obtenons théoriquement ci-dessous:

<u>Ac. gras</u>	<u>Beurre pur</u>	<u>Beurre + 2%</u> <u>de miglyol</u>	<u>Beurre + 3%</u> <u>de miglyol</u>	<u>Beurre + 4%</u> <u>de miglyol</u>
C4	3,6%	3,5%	3,5%	3,5%
C6	2,1%	2,1%	2,1%	2,0%
C8	1,2%	<u>2,3%</u>	<u>2,9%</u>	<u>3,5%</u>
C10	2,6%	3,3%	3,7%	4,1%
C12	3,0%	3,0%	3,0%	2,9%
C6/C8	1,75	<u>0,91</u>	<u>0,72</u>	<u>0,57</u>
C12/C10	1,15	<u>0,91</u>	<u>0,81</u>	<u>0,71</u>

Les taux ou rapports anormaux sont soulignés.

Nous constatons donc qu'on remarque facilement une anomalie lorsqu'on ajoute 2, 3, 4% de miglyol dans un beurre par les trois caractères suivants:

Taux d'acide caprylique élevé (supérieur à 2,2%)

Rapport C6/C8 faible (inférieur à 1,4)

Rapport C12/C10 faible (inférieur à 1)

Le taux élevé d'acide caprylique est le caractère le moins formel et, d'ailleurs, si le beurre qu'il faut tracer a au départ un taux d'acide caprylique inférieur à 1%, le taux final sera de l'ordre de 2% et on pourra mettre en doute le caractère naturel ou non du beurre.

Le rapport C12/C10 est plus explicite; pratiquement, il n'est jamais inférieur à 1 pour la matière grasse d'un lait de vaches. Cependant, s'il y a addition de lait de chèvres, le rapport C12/C10 descend en dessous de 1 (fromages mixtes: chèvre et vache).

Le rapport C6/C8 est par contre indiscutablement anormal.

L'addition de 4, 3 et même 2% de miglyol 812 à la graisse butyrique, constitue donc un traceur efficace pour la mise en évidence de beurres tracés purs, non redilués dans une matière grasse butyrique normale.

Cependant, il est demandé à un traceur, non seulement de permettre le dépistage des beurres dénaturés tels qu'ils ont été préparés au départ, mais aussi le dépistage de dilutions de 10, 5, voire 2% de beurre dénaturé dans un beurre normal.

Considérons donc les compositions des acides gras d'un beurre normal auquel on aurait ajouté 10% de beurre tracé à raison de 2, 3 et 4% de mi-

glycol, compositions équivalentes à celles de beurres normaux contenant 2, 3 et 4% de miglyol.

Nous obtenons les résultats ci-dessous:

<u>Ac. gras</u>	<u>Beurre pur</u>	<u>Beurre + 2%</u> <u>de miglyol</u>	<u>Beurre + 3%</u> <u>de miglyol</u>	<u>Beurre + 4%</u> <u>de miglyol</u>
C4	3,6%	3,6%	3,6%	3,6%
C6	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%
C8	1,2%	1,3%	1,4%	1,5%
C10	2,6%	2,7%	2,7%	2,75%
C12	3,0%	3,0%	3,0%	3,0%
C6/C8	1,75%	1,6%	1,5%	<u>1,4</u>
C12/C10	1,15	1,1	1,1	1,1

Ni les teneurs en acides gras, ni leurs proportions relatives ne sont anormales.

Dans le cas présent, seul le rapport C6/C8 de 1,4, pour le beurre additionné de 4% de miglyol peut prêter à suspicion.

Il faudra donc ordinairement ajouter plus de 4% de miglyol 812 à la graisse butyrique, pour permettre la mise en évidence de 10% de beurre dénaturé dans un beurre normal.

Le calcul permet également de montrer que dans certains cas extrêmes, on pourra même ajouter dans un beurre normal 25 à 30% d'un beurre tracé à raison de 4% de miglyol, avant de pouvoir établir formellement une anomalie. Etant donné qu'un taux de 4% de traceur dans un beurre paraît un maximum admissible, nous devons donc conclure que le miglyol 812 ne peut être considéré comme un traceur valable de la matière grasse butyrique.

Ces résultats théoriques ont été confirmés par l'expérience, grâce aux échantillons de miglyol qui nous ont été offerts par la firme productrice.

Conclusions

Le miglyol 812 ne peut être considéré comme un traceur valable de la matière grasse butyrique, car sa sensibilité, c'est à dire son efficacité en tant que traceur est insuffisante. Il en serait de même d'ailleurs du miglyol 810, dont la teneur en C8 est d'environ 30% supérieure à celle du miglyol 812, et dont le prix et la disponibilité commerciale excluaient d'ailleurs pratiquement le choix au préalable.

On pourrait également penser à la tributyrine, mais il est patent qu'on va s'acheminer vers les mêmes difficultés rencontrées au sujet du miglyol et même que ces difficultés pourraient être plus grandes en raison du

taux d'acide butyrique plus élevé dans le beurre que celui de l'acide caprylique et de la variabilité de ce taux.

En réalité, la recherche d'un traceur de la matière grasse butyrique dont la détermination repose sur l'analyse des acides gras, doit se référer à la composition des acides gras du beurre et à ses limites de variations. Il est illusoire de rechercher un traceur valable dont le principe de base serait la détermination d'un acide gras quelconque, si celui-ci est présent dans le beurre normal en quantité supérieure à 0,1 ou 0,2%, ce qui exclut pratiquement tous les acides saturés naturels à nombre pair de carbones de C4 à C20.

Parmi les acides non saturés naturels, il en est un qui se trouve en quantité dérisoire dans le beurre, l'acide C22:1, alors qu'une huile alimentaire répandue, l'huile de colza en contient généralement près de 50% des acides gras.

Nous étudierons donc, dans la deuxième partie de^{ce} chapitre VI, la possibilité du choix de l'huile de colza en tant que traceur de la matière grasse butyrique.

VI 2. L'HUILE DE COLZA

1. Composition et propriétés générales

L'huile de colza est une des huiles alimentaires les plus consommées dans le monde (la sixième en 1966). Parmi les pays producteurs et consommateurs, le Canada et l'Europe occupent une place de choix. Dans certains pays de la CEE la culture du colza a pris une telle extension depuis quelques années, qu'actuellement il se pose même un problème d'excédents difficile à résoudre.

L'huile de colza est utilisée comme huile de table et surtout comme matière première dans la fabrication des margarines et des shortenings.

Son coût est modique et de l'ordre de celui de nombreuses huiles alimentaires, puisqu'on peut l'obtenir au prix commercial de 0,35 U.C. par litre (1970).

Les huiles de colza peuvent avoir des compositions en acides gras différentes suivant les espèces cultivées. Cependant, de manière générale, le trait essentiel est la haute teneur en acide érucique ou acide docos - 13 énoïque (C22:1). Du point de vue alimentaire, l'acide érucique présenterait certains inconvénients dont le principal se situerait sur le plan de la digestibilité. Cependant consommée en quantité modérée (moins de 10% en poids de la ration alimentaire) et surtout en présence d'autres sources lipidiques, cet inconvénient disparaît complètement. En tout état de cause, aucune toxicité ne peut être attribuée à l'huile de colza en général et à l'acide érucique en particulier.

Les huiles d'origine européenne ont la composition moyenne en acides gras suivante:

Acide palmitique	C16	2,7 à 4%
Acide stéarique	C18	0,8 à 1,5%
Acide oléique	C18:1	10 à 16%
Acide linoléique	C18:2	12 à 18%
Acide linoléique	C18:3	7 à 10%
Acide arachidique	C20	Ca 1%
Acide gadoléique	C20:1	7 à 10%
Eicosadiénoïque	C20:2	Ca 1%
Acide béhénique	C22	Ca 1%
Acide érucique	C22:1	41 à 50%
Docosadiénoïque	C22:2	Ca 1%
Tétracosénoïque	C24:1(+C24)	Ca 1%

Récemment, au Canada on a mis au point une variété spéciale, la variété "canbra" donnant une huile pratiquement exempte d'acide érucique, celui-ci

étant remplacé dans la composition des acides gras par l'acide oléique. Cette huile "canbra" à 0% d'acide érucique, contiendrait plus de 60% d'acide oléique et sa composition en acides gras se rapprocherait de celle de l'huile d'olive.

La variété "canbra", si elle fait l'objet d'essais en Europe, où elle s'adapte très difficilement, n'y semble pas encore être cultivée sur une grande échelle à des fins commerciales.

2. L'huile de colza en tant que traceur de la matière grasse butyrique

2.1. Pouvoir traceur des différentes huiles de colza

Le pouvoir traceur des différentes huiles de colza étant basé sur la détermination du taux d'acide érucique, dépend essentiellement de ce taux. Plus le taux d'acide érucique d'une huile de colza sera élevé, meilleur sera son pouvoir traceur.

L'huile "canbra" à 0% d'acide érucique ou une huile dont la proportion d'acide érucique parmi les acides gras sera très faible (variétés issues de la variété "canbra" ou mélanges d'huile "canbra" avec des huiles normales), devra être exclue.

En fait, l'huile de colza choisie comme traceur devra être définie suivant sa richesse en acide érucique.

Actuellement, on pourrait se référer à l'origine, en émettant que cette huile doit être une huile commerciale originaire d'un pays de la CEE; cependant il faut être prudent et envisager l'avenir, en prévoyant le cas où la variété "canbra" ou une variété similaire pourrait être adaptée et cultivée sur une grande échelle en Europe. A notre avis, il faut exiger que l'huile utilisée comme traceur contienne dans sa composition en acides gras au moins 40% d'acide érucique, ce qui actuellement tient compte des variétés cultivées dans la CEE.

Pour des raisons commerciales, rien n'empêche d'ailleurs de décréter en même temps que l'huile utilisée comme traceur doit être originaire de la CEE.

Ayant spécifié la nature de l'huile de colza utilisée comme traceur, il est indispensable de connaître la proportion d'acide érucique et des autres acides supérieurs à nombre voisin de carbone, présents dans une matière grasse butyrique normale. Le taux de l'acide monoinsaturé C22:1 d'après la littérature serait de l'ordre de 0,02% dans le beurre et celui de l'acide saturé C22 (bénéfique) serait de l'ordre de 0,04%, donc deux fois supérieur.

L'analyse de nombreux beurres originaires de Belgique et d'Europe nous indique une teneur moyenne en C22 de l'ordre de 0,05% à 0,1%. Par contre la teneur en C22:1 ne dépasserait pas 0,02%. Le rapport entre les deux taux C22/C22:1 est en tout cas supérieur à 2.

Dans ces conditions, il suffit d'observer un déséquilibre important entre les taux des acides C22 et C22:1, par exemple un rapport C22/C22:1 de l'ordre de 2 ou mieux de l'ordre de 1, par l'adjonction de colza, pour conclure à une anomalie dans la composition du beurre.

Comme il n'y a pas plus de 0,1% d'acide béhénique dans le beurre, et que l'huile de colza contient en moyenne environ 45% d'acide érucique et 1% d'acide béhénique, une quantité minimale d'huile de colza amènera le taux d'acide érucique au niveau du taux d'acide béhénique.

2.2. Dose de traceur

On peut ici faire les mêmes remarques générales qui avaient été effectuées à propos du miglyol. On ne peut pas concevoir pratiquement une dénatura-tion du beurre par plus de 5% ou même plus de 4% d'huile de colza.

Empiriquement, nous avons donc dénaturé des beurres par 2, 3 et 4% d'une huile commerciale. La composition des acides gras de cette huile commercia-le établie suite à une chromatographie gazeuse sur une colonne polaire (D.E.G.S.) nous donne une teneur en acide érucique de 42 à 43%.

Le taux d'acide C22:1 des beurres tracés par 2, 3 et 4% d'huile de colza était de l'ordre de 1, 2, 1,6 et 2,2%, un peu supérieur au résultat qu'on obtiendrait théoriquement par le calcul basé sur la composition des acides gras.

La raison majeure de cette constatation réside dans le fait qu'en réalité, ce sont les acides gras qui sont analysés et non les glycérides.

Or, le rapport acides gras/glycérol de l'huile de colza est assez supérieur à celui de la matière grasse butyrique. Ceci est en relation avec la hau-te teneur en acides supérieurs de l'huile de colza et avec sa teneur rela-tivement élevée en acides inférieurs ou moyens de la matière grasse buty-rique.

Ainsi, on peut considérer que l'addition aux triglycérides d'un beurre d'un taux déterminé de glycérides d'huile de colza à 40 - 50% d'acide éru-cique, apporte environ et au moins la moitié de ce taux, estimé en acide érucique par rapport aux acides gras totaux.

On peut réaliser immédiatement par un simple calcul que l'huile de colza

sera un traceur extrêmement sensible. Si on dénature un beurre par une addition de 2% d'huile de colza, la dénaturation apportera sensiblement 1% d'acide érucique dans le beurre tracé, soit environ 50 fois plus que la quantité normale dans un beurre ordinaire. 2% d'huile de colza, soit 10% d'un beurre tracé par 2% d'huile de colza dans un beurre normal apporteront encore environ 0,1% d'acide érucique, quantité largement suffisante pour rendre anormal le rapport C22/C22:1 qui devient inférieur à 1.

Nos expériences ont été basées sur l'observation des rapports C22/C22:1 obtenus à partir de dilutions de beurre tracés à raison de 3% d'huile de colza dans un beurre normal.

La chromatographie gazeuse a été effectuée sur une colonne non polaire en acier inoxydable d'une longueur de 2 m, d'un diamètre de 3 mm, remplie de 4 à 5% SE 52 sur Aeropak 100 - 120. Nous avons travaillé en programmation de température de 170 à 270°C par 5°C/minute. Le système de détection était à ionisation de flamme.

Des dilutions dans un beurre normal de 15 - 10 - 5 - 2,5 - 1,25% de beurre tracé par 3% d'huile de colza ont été réalisées.

On a observé les proportions relatives des acides en C22 et C22:1 par rapport à celles existant dans un beurre normal.

La sensibilité de la méthode est telle qu'on peut même distinguer l'augmentation du taux d'acide érucique lors d'une addition de 1,25% de beurre tracé, mais on ne peut prétendre formellement qu'il s'agit d'une composition anormale.

Par contre, lors d'une addition de 2,5% de beurre tracé, soit 7,5% d'huile de colza dans un beurre normal, le rapport C22/C22:1 était inférieur à 2, fait que nous n'avons jamais remarqué dans nos analyses courantes lors d'une addition de 5% de beurre tracé, soit 15% d'huile de colza dans un beurre normal, le rapport C22/C22:1 était légèrement inférieur à 1.

Lors de l'addition de 10 à 15% de beurre tracé dans des beurres normaux, le rapport C22/C22:1 observé diminue avec la quantité de traceur ajouté. Cependant, la séparation de ces acides sur une colonne de silicone devient mauvaise, et toute mesure précise devient impossible dans les conditions où nous avons opéré.

Nous avons donc établi empiriquement, mais le calcul le laissait prévoir, qu'une dose de 3% d'huile de colza dans le beurre pouvait être suffisante en tant que traceur, puisqu'elle permet de se rendre compte de l'addition d'environ 2,5 à 5% d'un beurre tracé de cette manière, dans un beurre normal. Il n'est donc pas recommandé de choisir une dose supérieure, mais on

pourrait probablement choisir une dose inférieure, par exemple 2%, car la sensibilité serait encore suffisante.

Cependant, avant de fixer cette dose, il est bon au préalable de rechercher les difficultés qui pourraient surgir du choix de l'huile de colza en tant que traceur de la matière grasse butyrique et tout d'abord d'étudier l'influence de certains régimes alimentaires sur la composition en acides gras du lait de vaches.

3. Problèmes soulevés par le choix de l'huile de colza en tant que traceur de la graisse butyrique

3.1. Influence de régimes alimentaires contenant des tourteaux de colza sur la proportion d'acide érucique dans la matière grasse du lait de vaches

3.1.1. Expérimentation

Il est prouvé depuis longtemps qu'un régime alimentaire des vaches laitières riche en certaines matières grasses peut avoir une influence très grande sur la composition des acides gras du lait. On a pu apprécier ainsi l'influence d'un régime alimentaire contenant des tourteaux de coco sur l'équilibre des acides laurique et caprique de la matière grasse du lait. Le rapport C12/C10 du lait, voisin de 1 dans des conditions ordinaires, peut être multiplié facilement par quatre ou cinq dans certaines conditions de régimes alimentaires.

Le même phénomène remarqué à propos du rapport C12/C10, si la ration des vaches contient du tourteau de coco, ne va-t-il pas se produire à propos du rapport C22/C22:1, si la ration contient des tourteaux de colza?

Ce problème a fait l'objet de quelques essais réalisés avec la collaboration de la Station de Zootechnie de Gembloux.

Nous nous sommes procurés du tourteau de colza dans le commerce.

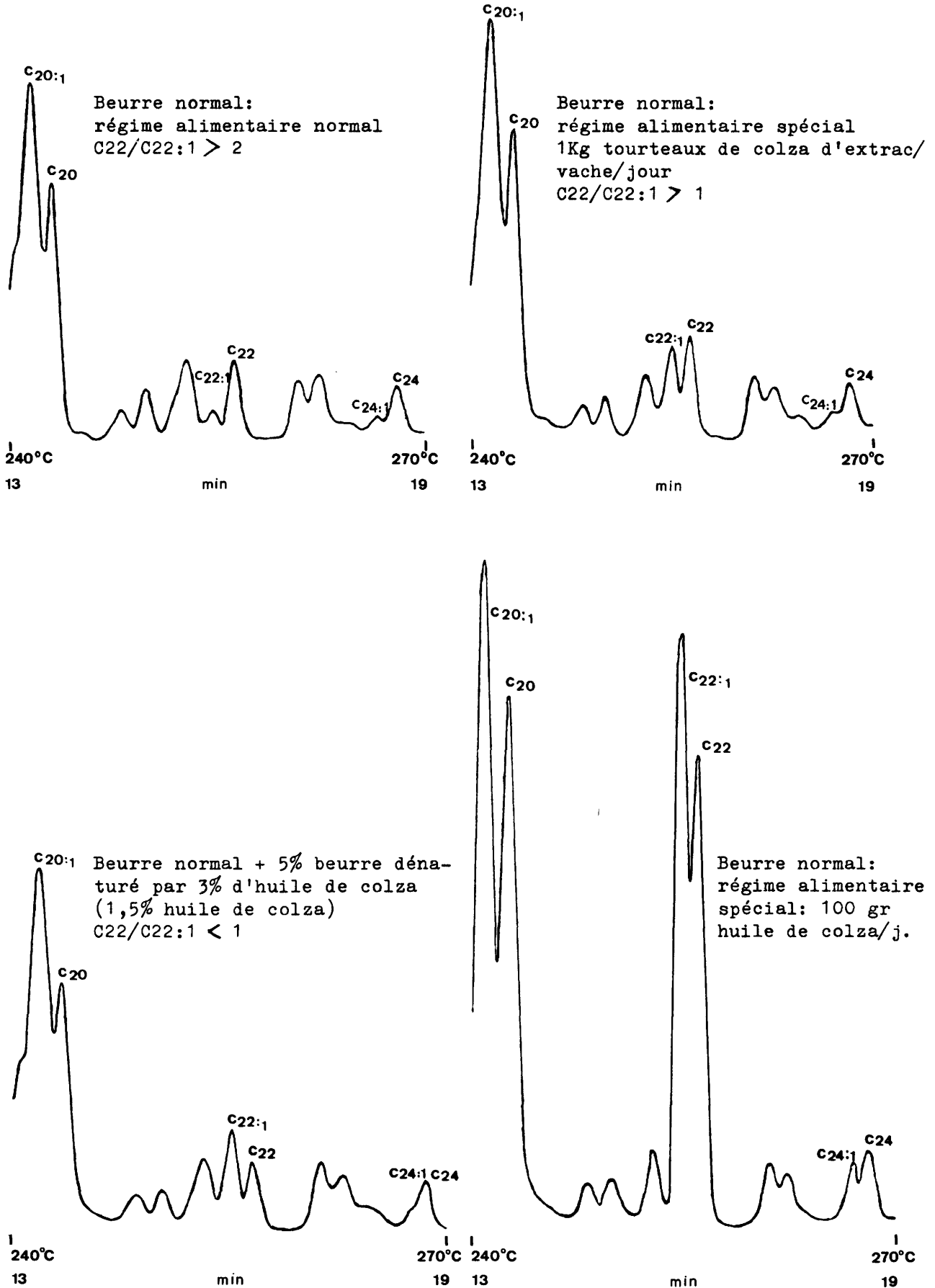
Ce tourteau avait la composition globale suivante:

Matière sèche:	M.S.	90,2%
Composition de la matière sèche:		
Cendres:		7,1%
Cellulose:		12,0%
Mat. grasse:		1,3%
Protéine:		35,6%
Extractif non azoté:		44,0%

L'analyse de ce tourteau révèle qu'il s'agit d'un tourteau d'extraction par opposition à un tourteau obtenu par pression. Nous n'avons pu obtenir

Dénaturation du beurre par l'huile de colza - Acides supérieurs

Col. ac. inox. 2 m, 3 mm - 4% SE 52 Aeropak 100 - 120



en Belgique de tourteaux de plusieurs origines. Cependant, certaines sources (Suède) indiquent une composition en matière grasse des tourteaux de colza de l'ordre de 8,5% ce qui correspond à la teneur d'un tourteau de pression. Nous nous sommes informés à ce sujet.

Il existe encore dans la CEE quelques rares petits fabricants qui pour des raisons diverses (équipement notamment) produisent des tourteaux "expellers" à 7 - 9,5% de matière grasse, mais ceux-ci ont pratiquement disparu du marché. Le tourteau est souvent de mauvaise qualité (oxydations rapides), très peu employé et, s'il est négocié, c'est uniquement sur un plan local.

Le tourteau de colza d'extraction a une teneur en matière grasse moyenne d'environ 1,5%.

Ce chiffre est susceptible de varier selon les fabricants et les appareils utilisés, mais toujours dans une fourchette assez étroite (1 à 2%). La teneur maximale rencontrée et généralement admise est de 2%.

En France, le tourteau de colza (extraction) est couramment incorporé dans les rations pour vaches laitières en raison de son prix nettement inférieur à celui des autres tourteaux.

Cependant sa faible appétence et la présence de composants à action anti-thyroïdienne limitent son emploi à 10% environ de la ration totale d'une vache laitière (environ 1,5 kg par animal).

Un lot de trois vaches laitières a reçu chaque soir pendant 11 jours, un kg de tourteaux de colza à 1,3% de matière grasse dans sa ration alimentaire.

L'analyse des acides gras de la matière grasse du lait a été effectuée premièrement pendant deux jours avant le début du régime et ensuite pendant la durée du régime. Le lait était traité le matin.

On a constaté une augmentation légère du taux d'acide érucique dès le lendemain matin de la mise en régime. Cette augmentation se marquait plus nettement le deuxième jour, augmentait encore légèrement le troisième jour pour rester sensiblement constante les jours suivants.

Le taux en acide béhénique avait aussi tendance à augmenter légèrement moins que le taux d'acide érucique.

Le rapport C22/C22:1 maximum est toujours resté supérieur à 1 et même de l'ordre de 2, correspondant sensiblement au rapport obtenu lorsqu'on ajoute 2,5% de beurre tracé par 3% d'huile de colza dans un beurre normal.

En conséquence, même dans le cas où les vaches reçoivent dans leur régime alimentaire une quantité normale de tourteaux de colza d'extraction, une

dose d'huile de colza de 3% comme traceur reste suffisante, car si elle ne permet pas de déceler 2,5% de beurre tracé dans un beurre normal, elle permet encore de déceler 5% de beurre tracé dans un beurre normal.

Etant donné qu'il n'est pas recommandé de donner plus de 1 kg ou 1,5 kg de tourteaux de colza par vache et par jour, nous avons augmenté artificiellement la richesse de ce tourteau en huile.

Lors d'une deuxième expérience, nous avons porté la quantité de matière grasse du tourteau à environ 100 gr (103 grammes) par addition de 90 grammes d'huile de colza raffinée du commerce.

Cette fois, le passage de l'acide érucique dans le lait est manifeste dès le premier jour, il s'accroît le deuxième jour où il est pratiquement maximum. Cependant, le taux d'acide béhénique (C22) continue à croître encore pendant au moins deux jours, une partie de l'acide érucique ayant été manifestement transformée en acide béhénique.

Après trois jours, le total C22 + C22:1 de la graisse du lait est passé d'environ 0,1% à près de 2%. Une bonne séparation n'a pu être obtenue entre ces deux acides, mais on peut escompter que le rapport C22:1/C22 n'était pas supérieur à 2.

L'addition d'huile de colza dans le régime alimentaire des vaches a également eu pour effet d'augmenter considérablement le taux des acides C20:1, C20, C24:1, C24 de la matière grasse du lait.

Ses conséquences sur la composition des acides gras du beurre sont donc assez différentes de celles d'une addition d'huile de colza dans la graisse butyrique elle-même.

Lors de la dénaturation du beurre par addition d'huile de colza, l'effet majeur est l'augmentation du taux d'acide érucique et du fait des faibles taux des autres acides présents dans l'huile de colza, particulièrement les acides C22 et C24:1, l'augmentation des teneurs de ceux-ci dans le beurre dénaturé sera à peine perceptible.

Il nous est apparu au cours de cette expérience que l'acide érucique de l'huile de colza raffinée, ajoutée dans le régime alimentaire paraissait passer plus rapidement dans la graisse du lait que l'acide érucique de l'huile incluse dans son tourteau.

Cette hypothèse a été vérifiée au moyen de l'essai suivant:

On a inclus simplement 10 gr d'huile de colza sans tourteau dans le régime alimentaire des vaches laitières, dès le lendemain, le taux d'acide érucique dans la graisse butyrique croît fortement et le rapport C22/C22:1 descend aux environs de l'unité. Le surlendemain, le rapport C22/C22:1 est inférieur à 1.

3.1.2. Conclusions

Les expériences ci-dessus indiquent que l'huile de colza résiduelle d'un tourteau d'extraction n'est assimilée que partiellement et avec un certain retard, étant sans doute toujours protégée contre les sucs intestinaux par une gangue cellulosique ou protéique elle-même difficilement digestible. L'huile de colza débarrassée de sa gangue protectrice est au contraire assimilée assez rapidement.

Pour l'efficacité d'une dose de 3% du traceur "huile de colza" dans le beurre, un régime alimentaire contenant des proportions non anormales de tourteaux de colza d'extraction, n'est pas à craindre. Le problème serait sans doute différent si le régime alimentaire contenait des tourteaux de pression.

Nous croyons cependant bon de faire remarquer qu'en fait, les tourteaux de colza commerciaux, en raison des contingences économiques, sont principalement et de plus en plus des tourteaux d'extraction, au point que l'on ne trouve pratiquement plus sur le marché dans la CEE des tourteaux de pression. De toute manière, les tourteaux de pression qui pourraient encore exister sur un plan local réduit sont destinés à disparaître car il s'agit le plus souvent de tourteaux de qualité médiocre obtenus par une technique dépassée. En outre, il est évident qu'il faudra éviter de donner des tourteaux de colza de qualité médiocre, principalement aux vaches laitières. Nous croyons donc que le problème de l'influence du régime alimentaire sur la teneur en acide érucique de la matière grasse du lait ne peut se poser que tout à fait sporadiquement et qu'il se posera de moins en moins, donc qu'il faut se garder de rejeter pour cette raison, le choix de l'huile de colza comme traceur.

Cependant, il est souhaitable de ne pas minimiser à l'excès la dose de traceur.

Le choix d'une dose de 3% d'huile de colza comme traceur dans le beurre, est, pour les raisons ci-dessus de loin préférable à celui d'une dose de 2%.

De toute manière, s'il est un litige quelconque, à propos de savoir si la présence d'un excès d'acide érucique dans le lait est due à un régime alimentaire particulier des vaches laitières ou à la présence d'huile de colza, l'analyse des stérols pourra résoudre facilement ce problème. L'huile de colza contient environ 0,6% de phytostérols totaux.

La chromatographie gazeuse des stérols permet de déceler facilement 0,1%

d'huile de colza dans le beurre par la présence de sitostérol et de brassi-castérol.

Les phytostérols de l'huile de colza digérés par la vache, ne passent pas dans le lait.

3.2. Problème économique relatif au prix de l'huile de colza

L'huile de colza est un traceur économique, puisqu'elle peut être livrée commercialement au prix de 0,35 U.C. le kg (1970). Etant beaucoup moins coûteuse que la matière grasse butyrique, on pourrait avoir tendance à augmenter la dose d'huile qui serait exigée légalement, lors de la dénaturation des beurres. On réaliserait ainsi un bénéfice facile au détriment d'ailleurs de la consommation réelle des excédents de matière grasse butyrique, et le pouvoir traceur n'en serait qu'affirmé.

Un tel problème s'était posé d'ailleurs à propos de l'huile de sésame et il n'avait pu être résolu, ce qui avait contribué à écarter l'huile de sésame comme traceur des beurres en dépit de certaines qualités indéniables. Il est donc indispensable de fixer une limite supérieure à l'addition de l'huile de colza dans le beurre et de pouvoir contrôler sensiblement cette limite.

Un contrôle effectif, alors qu'il était pratiquement impossible pour l'huile de sésame, est ici réalisable et même relativement facile.

En effet, on sait que la présence d'un pourcentage déterminé d'huile de colza à 40 - 50% d'acide érucique, amène le taux de celui-ci dans le beurre, relativement aux acides totaux, à environ la moitié de ce pourcentage ou légèrement davantage.

Si, par exemple, on fixe la dose de traceur de 2,5 à 3% d'huile de colza, le beurre dénaturé contiendra parmi ses acides gras, au minimum environ 1,2% d'acide érucique et au maximum environ 1,8% d'acide érucique.

Si on trouve 2% d'acide érucique, on peut considérer que la dénaturation a été effectuée par près de 4% d'huile de colza, ce qui, de toute manière, ne constituerait encore qu'une fraude insignifiante.

Pratiquement, nous suggérons donc d'établir à 2,5 à 3% d'huile de colza la dose de ce traceur à utiliser dans la graisse butyrique.

Un contrôle effectif suffisant sera effectué par le dosage de l'acide érucique dans le beurre tracé. Le taux de celui-ci devra être obligatoirement compris entre 1 et 2% des acides totaux de C4 à C22, saturés et insaturés.

Ce taux devra être établi après chromatographie gazeuse sur une colonne polaire (E.G.S., D.E.G.S., B.D.S., etc...).

Cependant, comme la présence de traces des acides érucique et béhénique est recherchée par chromatographie gazeuse sur une colonne non polaire, on peut opérer un contrôle sommaire suivant le procédé ci-dessous.

Le taux d'acide myristique (C14) des beurres est en moyenne de l'ordre de 10%.

On mesure l'aire du pic de l'acide myristique sur le chromatogramme de beurre réalisé avec une colonne apolaire (SE 30, SE 52, Apiezon etc...), on mesure l'aire du pic de l'acide érucique et on calcule le rapport des deux aires, C14/C22:1 - En pratique, C14/C22:1 sera compris normalement entre 5 et 10, pour un beurre tracé par 2,5 à 3% d'huile de colza.

3.3. Problème relatif aux qualités diététiques et au goût de l'huile de colza

Certains auteurs font état de qualités diététiques moindres pour l'huile de colza que celles d'autres huiles végétales, et signalent en particulier un retard dans la digestibilité et l'assimilation de l'acide érucique. Enfin, l'huile de colza présente parfois rapidement une altération de goût dénommée "réversion de flaveur".

Il est évident que ces remarques n'ont pas de sens, dans le cas qui nous préoccupe.

En effet, on peut répondre à la première qu'on n'attend pas précisément d'un traceur qu'il ait une valeur diététique, ni qu'il soit aussi facilement digestible que le beurre; d'autre part l'huile de colza sera consommée à des doses minimales dans les beurres tracés, alors que dans certains pays, elle est utilisée telle quelle comme huile de table.

A la deuxième remarque, on rétorquera que l'huile raffinée est une huile neutre; si elle est de bonne qualité, elle n'a aucun goût désagréable. Expérimentalement, nous avons d'ailleurs inclus 4% d'huile de colza dans huit échantillons de beurre, huit autres échantillons issus de la même crème servant de témoins.

Il a été totalement impossible à deux experts de séparer au cours d'une expertise organoleptique, les échantillons contenant de l'huile de colza de ceux qui n'en contenaient pas.

3.4. Problèmes relatifs aux techniques analytiques

L'analyse par chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides à 22 atomes de carbone n'est pas facile sur une colonne polaire, car celle-ci doit être portée à sa température maximum d'utilisation et de toute manière, la phase stationnaire se détruit rapidement et la colonne est rapidement inutilisable.

Sur une colonne non polaire, la séparation est également moins bonne, mais il n'y a aucun problème d'utilisation, si la phase résiste à une température de l'ordre de 250 à 300°C, ce qui est le cas des silicones.

Pour un contrôle rapide et économique, nous préconiserons donc d'utiliser une colonne non polaire. La technique que nous avons utilisée ne nécessitait pas plus d'une demi-heure par analyse chromatographique (détermination des rapports C22/C22:1 et C14/C22:1) et est très efficace.

B. SYNTHESES ET CONCLUSIONS GENERALES

1. Utilisations comparées du sésamol, de la vanilline et des sitostérols en tant que traceurs de la matière grasse butyrique

Les résultats de nos recherches sur l'aptitude des trois produits commerciaux, sésamol, vanilline et sitostérol, à être utilisés en tant que traceurs de la matière grasse butyrique, aux doses prescrites par le règlement CEE n° 1390/69 du 18 juillet 1969 (respectivement 100, 200 et 300 gr par tonne), nous ont conduits à établir le tableau synoptique ci-après (1.1.) et à en dégager les conclusions qui s'imposent.

1.1. Tableau synoptique

<u>Caractères principaux examinés</u>	<u>Sésamol</u>	<u>Vanilline</u>	<u>Sitostérol</u>
1. produit commercial			
1.1. Siège des firmes productrices	USA Commercialisé en Europe par une firme CEE (Pays Bas). Les firmes européennes sont susceptibles de le produire	C.E.E. 98 - 100 %	C.E.E. (France) 90 - 94%
1.2. Pureté en % de traceur utile	99 - 100 %		
2. Coût de la dénaturation par tonne de beurre, taxe non comprise, en U.C. (1970)	9,7 U.C.	1,28 U.C.	4,44 U.C.
3. Coût proportionnel relativement à la dénaturation par la vanilline	7,5	1	3,5
4. Possibilités de mise en évidence de:			
4.1.1. Test simple, rapide ou moyennement rapide mais applicable en séries	Réactif de Villavecchia appl. en couche mince (test spécifique)	Réactif à la benzidine appl. en couche mince appl. spécifique	néant
4.1.2. Test long et très coûteux, difficilement appl. en séries spécifiques	-	-	Techniques de chromatographie gazeuse (limite de sensibilité)
4.2. <u>5% de beurre dénaturé dans un beurre normal</u>			
4.2.1. Test simple et très rapide, applicable en séries	Test classique de Villavecchia. Test spécifique (2 à 3%)	Réaction à l'indol: non spéc. (5%) Test à la d.n.p.h.: non spéc. (5 à 10%)	néant
4.2.2. Test spécifique long coûteux, mais applicable en séries			Chromatographie en couche mince des acétates de stérols (5 à 10%)

4.3. <u>10 à 20% de beurre dénaturé dans un beurre normal</u>	-	-	Indications données par le P.F. des acétates de stérols
4.3.1. Test assez long et coûteux non spécifique	-	-	Chromatographie en couche mince des acétates de stérols
4.3.2. Test spécifique long, coûteux, mais applicable en séries	-	odorat	-
4.4. <u>Plus de 20% de beurre dénaturé dans un beurre normal</u>	-	-	Point de fusion des acétates de stérols - Examen microscopique
4.4.1. Test simple direct	-	0,5%	1 à 2%
4.4.2. Test simple assez long et coûteux non spécifique	1%	Possible mais difficile	Relativement facile
5. <u>Limites pratiques de mise en évidence du test le plus sensible en % de beurre dénaturé réglementaire (CEE n° 1390/69) dans un beurre pur</u>			
6. <u>Possibilités pratiques et économiques d'élimination du révélateur</u>			
6.1. Taux d'élimination 99-100%			
6.1.1. Par lavage avec des solutions aqueuses alcalines et avec élimination des savons	Possible	Possible	Impossible
6.1.2. Par "stripping" (200°C, 5 mm Hg - 2-5% vapeur/h; 2 h)	Possible	Possible	Impossible (élimination restreinte et non sélective)
6.2. Taux d'élimination: environ 75%			
6.2.1. Par lavage avec des solutions aqueuses alcalines et avec élimination des savons	Possible	Facile	Impossible

<p>7. Emploi éventuel des produits de substitution des traceurs</p>	<p>Huiles de sésame sésamoline</p>	<p>p.h. benzaldéhyde</p>	<p>a) Huile végétale sauf h. de coton et d'olive b) Huiles de coton et d'olive</p>
<p>7.1. Mise en évidence éventuelle de ces produits de substitution</p>	<p>Chrom. en couche mince</p>	<p>Chrom. en couche mince</p>	<p>a) Recherche de stigmasterol par chromatographie gazeuse b) Analyse des acides gras et analyse de l'insaponifiable (Tests spécifiques)</p>

Remarques générales quant au texte des règlements communautaires

- a) Les règlements C.E.E. n° 1390/69, 1732/69 (textes français), et tous les règlements C.E.E. qui traitent du problème des révélateurs prescrivent les doses de traceurs à ajouter par tonne de beurre. Nous estimons qu'il serait plus logique de prescrire les doses de traceurs par tonne de graisse butyrique, puisque les traceurs sont dissous, pour l'essentiel, dans la graisse butyrique. Cette manière de procéder éviterait des calculs en matière de contrôle, et étendrait, sans modification du texte de base, la portée des règlements, non seulement aux beurres, mais aussi aux "butter oils" et aux beurres concentrés, quelle que soit la teneur en eau ou en extrait sec dégraissé de ces produits.
- b) Les bêta et gamma sitostérols sont inséparables par les méthodes de détection ordinaires utilisables en vue du contrôle de la pureté des corps gras. Les sitostérols commerciaux sont des mélanges de bêta et de gamma sitostérols, à très forte proportion de bêta sitostérol. Comme impureté principale, notons le campestérol qui est également un phytostérol. En conséquence, nous suggérons que les règlements C.E.E. prescrivent la nature des sitostérols employés comme traceurs en bêta et gamma sitostérols ou en sitostérols totaux bêta et gamma, ou mieux encore en 24 b et a éthyl cholestérol et non uniquement en bêta sitostérol.

1.2. Conclusions

1.2.1. Observations relatives à l'utilisation de chaque traceur

a) Le sésamol

Ce traceur étant en grande partie éliminable par des méthodes relativement simples, applicables par tous les "retravailleurs" de beurres, il faut tenir compte dans l'établissement des doses à employer comme traceurs, de cette élimination partielle toujours possible.

En fait, il est nécessaire de savoir retrouver facilement, non pas seulement un faible taux de beurre tracé par la dose réglementaire de sésamol, mais bien le même taux de beurre tracé par le quart environ de la dose réglementaire.

Nous nous référons ici au chapitre 4.1.2. sur le sésamol de notre rapport détaillé ci-annexé. Ce chapitre a pour titre "Élimination du sésamol par des solutions diluées de soude".

Selon cette constatation, nous considérons que la dose réglementaire de 100 gr de sésamol/tonne est la dose minimum qui peut être introduite dans

les beurres tracés, et qu'il est dangereux de la diminuer de moitié (Décisions C.E.E. 69/438 et 70/63 concernant la vente des beurres concentrés pour la cuisine sur le marché belge).

L'application du test de Villavecchia, test spécifique, est plus ou moins élaborée suivant la teneur en beurre tracé que l'on veut mettre en évidence dans un beurre normal. Le test appliqué après chromatographie sur couche mince à l'avantage de requérir pratiquement la même préparation que le test à la benzidine (ou au sulfate d'hydrazine) préparé en vue de la mise en évidence de la vanilline, et il est plus sensible que le test appliqué d'une manière classique.

Sur le plan analytique, le règlement C.E.E. n° 1390/69, prévoyant l'addition simultanée, comme traceurs, de 100 gr de sésamol et de 200 gr de vanilline/tonne de beurre paraissait donc heureusement conçu, puisque les tests de mise en évidence de ces deux produits peuvent requérir les mêmes préparations. Sur le plan pratique, il y a cependant des réserves à faire comme nous le dirons plus loin.

Le sésamol est pratiquement entièrement éliminable par "stripping" dans des conditions précises, sans altération commercialement fort gênante de la matière grasse butyrique.

En conséquence, si on veut garder au sésamol toute sa valeur et toute son efficacité en tant que traceur, deux conditions essentielles devront être remplies, soit:

- 1) La dose réglementaire de sésamol par tonne de graisse butyrique tracée doit atteindre au moins 100, sinon 200 gr/tonne;
- 2) Un contrôle sévère des installations de "stripping" chez les "retravailleurs" utilisant de la matière grasse butyrique est indispensable. Le "stripping" n'étant pratiqué que par un nombre très restreint de ceux-ci dans chaque pays de la C.E.E., un tel contrôle devrait être possible.

Cependant, il ne faut guère se leurrer; un équipement de désodorisation de base, qui permet d'effectuer correctement et économiquement les opérations de "stripping", ne coûte pas cher, eu égard aux bénéfices importants, si le sésamol est maintenu comme traceur, qu'un tel équipement pourrait assurer à tous ses utilisateurs.

Il ne sera jamais facile de contrôler les installations de "stripping" surtout si celles-ci viennent à se multiplier, parce que le contrôle de l'utilisation régulière d'une technique industrielle dans un domaine déterminé, est toujours très difficile.

En conséquence, nous estimons de toute façon qu'il est urgent de prévoir à court terme, le remplacement du sésamol, au moins comme traceur unique (ou avec la vanilline) d'une matière grasse butyrique, par un traceur moins facilement éliminable.

La sésamoline, non éliminable par "stripping" (ou produit de structure proche), si elle peut être produite commercialement, pourrait avantageusement remplacer le sésamol en tant que traceur de la matière grasse butyrique.

b) La vanilline

La vanilline étant trop facilement éliminable par des techniques très simples, applicables par tous les "retravailleurs" de beurre, nous n'estimons pas que son emploi en tant que traceur de la matière grasse butyrique doive être maintenu.

Notons qu'un simple lavage d'un volume de graisse butyrique tracée (200 gr de vanilline/tonne) par un volume double d'eau chaude à environ 65°C élimine de 40 à 50% de la vanilline totale.

Un simple lavage d'un volume de graisse butyrique tracée (200 gr de vanilline/tonne) par un volume double de solution aqueuse légèrement ammoniacale en élimine 97%.

Cette technique d'élimination ne nécessite rien d'autre que le matériel couramment utilisé en laiterie ou en beurrerie.

La vanilline était malheureusement le traceur le moins cher, et celui dont les tests de mise en évidence étaient les plus sensibles.

La vanilline est éliminée par des techniques fort semblables à celles qui peuvent être utilisées en vue de l'élimination du sésamol, mais les conditions d'application de ces techniques seront apparemment moins sévères.

Le "stripping" de la matière grasse butyrique tracée, dans ses conditions d'application les plus courantes, élimine aussi bien la vanilline que le sésamol.

Suivant cette constatation et selon un point de vue pratique, l'addition simultanée comme traceurs, de 100 gr de sésamol et de 200 gr de vanilline par tonne de graisse butyrique, prescrite par le règlement C.E.E. n° 1390/69, n'est donc pas tellement heureuse, puisque ces deux traceurs peuvent être pratiquement éliminés simultanément.

c) Le sitostérol

Le sitostérol (bêta et gamma) s'est révélé parmi les trois traceurs comparés sur le tableau 1.1. le traceur le meilleur de la matière grasse butyrique car il n'est ni pratiquement, ni économiquement éliminable de celle-ci. Malheureusement, on ne détermine des taux suffisamment faibles de ce bon traceur, dans une matière grasse butyrique que par les tests les plus chers et les plus longs.

Il s'agit des techniques de chromatographie gazeuse des stérols et de leurs dérivés.

Ces techniques supposent l'emploi, par des techniciens suffisamment compétents, d'appareils coûteux et fragiles. Le test et sa préparation s'étalent sur deux jours au minimum. Même si on effectue les analyses en série, un seul technicien ne disposant que d'un seul appareil de chromatographie gazeuse, ne peut espérer effectuer plus d'une quinzaine de déterminations par jour. Aucune méthode de chromatographie gazeuse des stérols n'est encore standardisée, car, vu la diversité des techniques et des appareils, la standardisation est difficile.

Cependant, un test plus simple, normalisé, permet de déceler ou au moins de suspecter la présence de sitostérols dans une matière grasse butyrique. Il s'agit de la détermination du point de fusion des acétates de stérols et de l'examen microscopique des cristaux de stérols.

Cette méthode n'a pratiquement qu'une valeur indicative si le beurre examiné ne contient que 10 à 20% de beurre tracé (300 gr/tonne), mais elle devient un test si l'échantillon de beurre à examiner contient un taux minimum de l'ordre de 20% de beurre tracé à raison de 300 gr de sitostérol par tonne.

Ce test, bien que non spécifique, permet d'établir facilement et avec une assez bonne sensibilité, une anomalie dans la composition chimique d'une matière grasse quelconque. Nous considérons qu'il doit au moins servir de test d'orientation, avant l'analyse en chromatographie gazeuse. Il sélectionnera les matières grasses butyriques que l'on considérera comme pures (p.f. acétates $\leq 115^{\circ}\text{C}$), les beurres suspects d'addition de beurres tracés ou de matières grasses végétales (p.f. acétates compris entre 115 et 117°C), et les beurres plus fortement additionnés de beurres tracés ou de matières grasses végétales (p.f. acétates $> 117^{\circ}\text{C}$).

Suivant cette conception, nous estimons qu'il serait malencontreux de

* Notons toutefois la norme récente de la Fédération Internationale de laiterie

diminuer la dose de traceur à ajouter par tonne de graisse butyrique, com-
l'ont permis pour les beurres concentrés à l'usage du marché belge, les
décisions C.E.E. 69/438 et 70/63.

En effet, 150 gr de sitostérol/tonne ne permettront de retrouver facile-
ment, par un test simple, ne nécessitant pas l'emploi d'une technique de
chromatographie, qu'environ 40% de beurre tracé dans un beurre normal.
Nous considérons même qu'il serait plutôt souhaitable d'augmenter la dose
de produit traceur, en la portant par exemple à 500 ou même 600 grammes/
tonne de graisse butyrique.

L'utilisation d'une telle dose de sitostérol dans les beurres tracés, ren-
drait possible la détermination, par la même méthode simple d'environ 10%
de beurre tracé dans un beurre normal.

Des indications nettes seraient encore fournies permettant de soupçonner
la présence, dans un beurre normal, de 5 à 10% de beurre tracé par de tel-
les doses de sitostérols.

L'emploi comme traceur d'une dose de 600 gr de sitostérols commerciaux
par tonne de graisse butyrique serait encore un peu moins coûteux que l'em-
ploi actuel (1970), comme traceur, d'une dose de 100 gr de sésamol par ton-
ne de graisse butyrique.

1.2.2. Comparaison entre les aptitudes respectives de chaque produit en tant que traceur

Du tableau synoptique 1.1., il ressort clairement que le sitostérol est le
meilleur des trois traceurs étudiés, si on considère que la qualité essen-
tielle d'un bon traceur est de ne pas pouvoir être éliminé économiquement
de la matière grasse.

Le sitostérol est pratiquement et sélectivement, parmi ces trois révéla-
teurs, le moins éliminable de la matière grasse butyrique par des techniques
industrielles économiques. Son prix n'est pas très élevé, compte tenu des
doses prescrites par le règlement C.E.E. 1390/69 (300 gr/tonne).

Après le sitostérol, le sésamol peut aussi être considéré comme un traceur
valable, à condition de pouvoir contrôler, en dehors des huileries et mar-
garineries, les quelques établissements dans chaque pays qui disposeraient
d'appareillages, notamment de désodorisateurs permettant de l'éliminer pra-
tiquement totalement et peut-être aussi, à condition de relever la dose
prescrite par le règlement C.E.E. 1390/69 (100 gr/tonne).

L'élimination du sésamol par lavages de la graisse dénaturée avec des solu-
tions aqueuses alcalines est possible industriellement, mais postule éga-

lement un équipement adéquat pour "raffiner" la matière grasse qui pourrait être altérée.

Le sésamol est de loin le traceur le plus coûteux, mais c'est aussi celui qui sera mis en évidence le plus facilement, à une sensibilité très grande, par un test très simple.

La vanilline est le moins bon des trois traceurs, car son élimination peut être pratiquement totale, non seulement en utilisant les mêmes techniques que le sésamol, mais encore en utilisant des techniques beaucoup plus simples. La sensibilité de sa mise en évidence, par une méthode relativement simple, est par contre la plus grande.

Son coût, aux doses prescrites par le règlement C.E.E 1390/69 (200 gr/tonne) est également de loin le moins élevé.

2. Utilisations comparées des chlorophylles et de l'éthoxyquine en tant que traceurs de la matière grasse butyrique

Le règlement C.E.E. n° 1732/69 de la Commission du 1er septembre 1969, article 3, alinéa b, avait prévu de dénaturer certains mélanges de graisses, dont une partie de matière grasse butyrique, par 8 gr de chlorophylle pure (E 140) et 150 gr d'éthoxyquine (E 322) par tonne de corps gras. Ces graisses dénaturées étaient destinées à entrer dans la composition de concentrés pour l'alimentation animale.

Le tableau synoptique 2.1. rend compte succinctement des essais effectués et de leurs résultats et permet une comparaison rapide entre les avantages et les inconvénients relatifs à l'utilisation de chaque traceur.

2.1. Tableau synoptique

<u>Caractères principaux examinés</u>	<u>Chlorophylles</u>	<u>Ethoxyquine</u>
1. <u>Produit commercial</u>	Chlorophylles non cuivrées oléosolubles dites "E 140" (phéophytines) Chlorophylles cuivrées oléosolubles	Ethoxyquine ou Santoquin liquide
1.1. <u>Siège des firmes productrices</u>	C.E.E.	USA (Monsanto) Filiales européennes
1.2. <u>Pureté en % de traceur utile</u>	4 à 16% (par dosage de l'azote)	environ 100% (par spectrophotométrie U.V.)
2. <u>Coût de la dénaturation par tonne de beurre (règlement 1732/69)</u>	Phéophytines (E 140) 0,3 U.C. Chlorophylles cuivr. 1,6 U.C.	0,27 U.C.
3. <u>Tests et méthodes de mise en évidence de la dénaturation</u>	Coloration verte ou grise verdâtre	néant
3.1. <u>Test simple, visuel immédiat</u>		
3.2. <u>Test simple, visuel par fluorescence</u>	Fluorescence rouge pour les chlorophylles non cuivrées (E 140)	Fluorescence bleue violette intense
3.3. <u>Méthodes analytiques</u>	Spectrométrie et fluorimétrie	Spectrométrie U.V. et fluorimétrie
4. <u>Possibilité de mise en évidence de:</u>		
4.1. <u>la graisse dénaturée pure suivant le règlement 1732/69 (8gr chlor/tonne 150 gr éthox/tonne)</u>	a) Par le test 3.1.; impossible concentration en chlor. non cuivrée trop faible b) Par le test 3.2.; impossible (concentration en chloroph. non cuivrée trop faible) c) Par les méthodes 3.3.; limite de sensibilité des méthodes fluorimétriques	a) néant b) très facile; fluorescence bleue intense c) très facile par des méthodes fluorimétriques

4.2. 10% de graisse dénaturée dans un beurre normal	Impossible	Très facile grâce au test 3.2.
4.3. 5% de graisse dénaturée	Impossible	Possible grâce au test 3.2.
4.4. 1% de graisse dénaturée dans un beurre normal	Impossible	Possible par extraction analytique et séparation en c.c.m.
5. Limites pratiques de mise en évidence du test le plus sensible en % de beurre dénaturé réglementaire (règl. CEE 1732/69) dans un beurre normal	Environ 50 à 70%	Traces (0,1%)
6. Possibilités pratiques et économiques d'élimination du traceur		
6.1. Taux d'élimination 95 - 97%		
6.1.1. Par extraction aux solvants	Élimination économiquement impossible	Élimination possible et relativement facile. (extraction par des sol. aqueuses acides)
6.1.2. Par action de la chaleur et de l'oxydation	Dégradation des chlorophylles, mais les produits de dégradation peuvent être mis en évidence	Dégradation de l'éthoxyquine mais certains produits d'oxydation ont une fluorescence typique facile à mettre en évidence
6.1.3. Par "stripping" (200°C, Imm Hg, 5% de vapeur/h, 2 h)	Élimination impossible	Élimination possible mais formation de produits d'oxydation fluorescents. Le pouvoir traceur ne disparaît pas
6.1.4. Par filtration sur charbon actif	Élimination très facile	Élimination impossible
6.2. Taux d'élimination 97 - 100%		
6.2.1. Par extraction aux solvants (solutions aqueuses acides)	Voir 6.1.1.	Élimination totale de l'éthoxyquine mais non de tous les dérivés fluorescents. Élimination totale du pouvoir traceur pratiquement impossible

<p><u>6.2.2.</u> Par action de la chaleur et de l'oxydation</p>	<p>Voir 6.1.2.</p>	<p>Elimination totale de l'éthoxyquine possible, mais élimination totale du pouvoir traceur économiquement impossible</p>
<p><u>6.2.3.</u> Par "stripping" (200°C, Imm Hg, 5% vap/h, 2 h)</p>	<p>Voir 6.1.3.</p>	<p>Elimination totale de l'éthoxyquine difficile, mais élimination totale du pouvoir traceur impossible</p>
<p><u>6.2.4.</u> Par filtration sur charbon actif</p>	<p>Elimination facile et totale de toutes les chlorophylles et de leurs dérivés</p>	<p>Elimination impossible</p>
<p>7. Emploi éventuel de produits de substitution des traceurs</p>	<p>Les chlorophylles commerciales oléosolubles, les chlorophyllines. Techniques de séparation par Ccm Techniques d'analyse par spectrométrie d'absorption ou fluorimétrie</p>	<p>-</p>
<p>7.2. Possibilités pratiques et économiques d'élimination des produits de substitution éventuels</p>	<p>Les chlorophylles commerciales oléosolubles et leurs dérivés sont totalement éliminables des corps gras par filtration sur charbon actif 320 gr de phéophytines/tonne</p>	<p>-</p>
<p>8.1. Prix de revient/tonne d'une telle dénaturation</p>	<p>80 gr de chlorophylles cuivrées oléosolubles/tonne</p> <p>12 à 16 U.C.</p>	<p>-</p>
<p>9. Dose de traceur jugée suffisante pour les besoins analytiques et en tant que traceur</p>		<p>100 à 150 gr/tonne</p>

2.2. Conclusions

2.2.1. Observations relatives à l'utilisation de chaque traceur

a) Les chlorophylles

Le règlement C.E.E. 1732/69 de la Commission du 1er septembre 1969 spécifie (art. 3, alinéa b) la nature et la teneur de la chlorophylle qui doit être ajoutée dans certaines préparations commerciales de graisses.

L'addition doit être de 8 grammes par tonne de corps gras, de chlorophylle pure E 140.

Celle-ci est définie par la Directive du Conseil du 11/11/1962 modifiée en dernier lieu par la Directive du Conseil du 13/7/70 comme étant le complexe magnésien de la tétraméthyl 1 - 3 - 5 - 8, éthyl 4, vinyl 2, céto 9, carbométhoxy 10, phytyl propionate 7 phorbine (chlorophylle a) et de la triméthyl 1 - 5 - 8, formyl, éthyl 4, vinyl 2, céto 9, carbométhoxy 10, phytyl propionate 7 phorbine (chlorophylle b).

Or, ces chlorophylles naturelles, telles qu'elles sont définies (E 140), sont éminemment instables et ne pourraient se conserver dans les graisses. Elles ne sont d'ailleurs pas commercialement offertes comme chlorophylles oléosolubles.

On rencontre dans le commerce comme chlorophylles oléosolubles:

des phéophytines (chlorophylles exemptes de magnésium) qui sont d'ailleurs parfois improprement appelées du nom "chlorophylle E 140";

des chlorophylles cuivriques ou chlorophylles dans lesquelles le cuivre a remplacé le magnésium (partie oléosoluble du complexe E 141).

Le règlement C.E.E. 1732/69 doit donc en premier lieu être modifié afin de tenir compte des produits commerciaux oléosolubles disponibles sur le marché.

Cependant, les phéophytines sont un mauvais traceur; en effet:

- 1) A des doses peu élevées (inférieures à 32 grammes/tonne), elles ne confèrent aux corps gras dans lesquels elles sont dissoutes, que des teintes ternes grises ou brunes verdâtres peu caractéristiques.
- 2) Le titre mesuré suivant la teneur en azote n'a principalement qu'une valeur commerciale et peu de valeur analytique, car il ne nous indique pas la teneur réelle en phéophytines ou en dérivés des chlorophylles des préparations commerciales.

- 3) Les préparations des chlorophylles sont assez variables suivant les sources commerciales et ne peuvent être dosées ou même estimées avec une précision suffisante au sein des matières grasses.
- 4) Les phéophytines et autres chlorophylles oléosolubles, telles les chlorophylles cuivriques et leurs dérivés peuvent être éliminées sans difficultés majeures de la matière grasse par filtration sur charbon actif ou terres décolorantes.

Notons cependant que l'élimination des chlorophylles relève davantage des traitements industriels des corps gras (raffinage), que l'élimination de l'éthoxyquine.

Pour éliminer des matières grasses, les chlorophylles et leurs dérivés, il faut nécessairement s'équiper dans ce but; pour éliminer l'éthoxyquine et la majeure partie de ses dérivés, on peut trouver pratiquement tout l'équipement et le matériel nécessaires en laiterie.

L'emploi de HCl normal, au cours de lavages répétés (deux ou trois) produit cependant une hydrolyse appréciable de la matière grasse, de telle sorte qu'il est quand même souhaitable et souvent nécessaire de neutraliser la graisse ou d'enlever l'excès d'acides libres par un processus industriel approprié tel le "stripping".

- 5) Si on juge qu'un traceur visuel immédiat doit rendre possible la mise en évidence directe, par la vue, de 10% d'un beurre tracé dans un beurre normal, la dénaturation d'une tonne de mélange gras devrait être effectuée par environ 320 gr de phéophytines. Le prix de revient de la dénaturation par tonne de graisse serait alors de l'ordre de 12 U.C., ce qui peut paraître excessif pour des opérations de dénaturation de graisses destinées à l'alimentation animale.

Les chlorophylles cuivriques oléosolubles constitueraient un meilleur traceur que les phéophytines, car leur teinte verte bleuâtre est nettement plus caractéristique.

Cependant, si la sensibilité à l'examen visuel est quatre à cinq fois plus élevée que pour les phéophytines, le prix est aussi d'un ordre cinq fois plus élevé.

D'autre part, les chlorophylles cuivriques présentent sensiblement les mêmes désavantages en tant que traceurs que les phéophytines.

Les sources commerciales sont variables et le titre est mesuré de la même façon.

Elles sont également difficilement estimables au sein des matières grasses et peuvent être éliminées par filtration sur les mêmes adsorbants.

En outre, la présence de cuivre peut être un inconvénient; nous estimons cependant cet inconvénient limité si les graisses tracées sont destinées à l'alimentation animale et si, comme c'est le cas, elles contiennent également un antioxydant (éthoxyquine).

b) L'éthoxyquine

Au contraire des chlorophylles, l'éthoxyquine est un produit qui peut être obtenu commercialement à un haut degré de pureté, à un prix très économique.

Si elle ne confère pas directement aux corps gras dans lesquels elle est dissoute, une teinte nette perceptible directement par l'oeil, sa fluorescence bleue violette intense sous une lampe U.V., en fait un traceur semi-immédiat extrêmement sensible.

L'éthoxyquine étant un antioxydant puissant, se dégrade lentement dans les matières grasses par oxydation. A température ordinaire (env. 20°C), cette dégradation est très lente, et aux concentrations voisines de 150 gr par tonne, quasi imperceptible après plusieurs semaines.

A température plus élevée (70°C ou 100°C), la dégradation est plus rapide et, suivant l'importance du contact avec l'air, la disparition de l'éthoxyquine en tant qu'antioxydant peut être complète après quelques jours seulement.

L'éthoxyquine peut malheureusement être facilement extraite des corps gras par simple lavage par des solutions aqueuses acides, ou être quasi totalement éliminée des processus de "stripping" applicables en tant que techniques de désodorisation des matières grasses.

Cependant, au sein des corps gras, l'éthoxyquine est toujours accompagnée de quelques produits d'oxydation.

Ceux-ci ne sont pas totalement extractibles par des solutions aqueuses acides et gardent une certaine fluorescence. On peut les extraire facilement dans le méthanol, les concentrer et les mettre en évidence par chromatographie sur couche mince; le test est extrêmement sensible et relativement simple.

En conséquence, le pouvoir traceur n'est jamais réduit à néant.

Il peut toutefois être réduit suffisamment pour qu'il ne puisse plus être perçu visuellement en plaçant l'échantillon de graisse traitée sous une lampe U.V. En quelque sorte, le pouvoir traceur visuel (fluorescence) semi-

immédiat de l'éthoxyquine peut être facilement anéanti au sein des corps gras, mais non son pouvoir traceur analytique.

Pour cette raison, à défaut d'un révélateur meilleur, sur la base de l'aspect analytique et économique du choix d'un traceur pour la matière grasse butyrique et sous réserve d'autres considérations, principalement biologiques, nous continuons à considérer l'éthoxyquine comme un traceur valable des corps gras, sans être un excellent traceur.

Nous estimons qu'actuellement, il est souhaitable que la C.E.E. la maintienne comme révélateur des graisses dénaturées à destination de l'alimentation animale, à la dose prescrite par son règlement 1732/69, soit 150 gr/tonne.

2.2.2. Observations relatives à l'utilisation simultanée de chlorophylle et d'éthoxyquine comme traceurs

L'emploi simultané des deux traceurs, chlorophylle et éthoxyquine, ne se justifie, à notre avis, que si la nature et la quantité de chlorophylle utilisée, permettent de se rendre compte directement de la dénaturation de la graisse, par observation visuelle d'une teinte verdâtre suffisamment caractéristique.

Il faut cependant en premier lieu modifier le texte du règlement CEE 1732/69, qui préconise l'emploi de chlorophylles E 140, et remplacer celle-ci par une chlorophylle commerciale oléosoluble à préciser, soit une chlorophylle non cuivrique (phéophytines) ou mieux une chlorophylle cuivrique. Si on désire que le traceur visuel immédiat permette la mise en évidence de 10% de graisse dénaturée dans un beurre normal, il serait nécessaire d'ajouter environ 80 grammes de chlorophylles cuivriques pures à la tonne, ce qui rendrait peut-être le prix de la dénaturation prohibitif (16 U.C.). Comme le traceur visuel immédiat, la chlorophylle, est accompagné d'un traceur analytique très sensible, l'éthoxyquine, il n'est pas nécessaire de pousser la dénaturation par le traceur visuel jusqu'à obtenir une telle sensibilité (mise en évidence visuelle de 10% de graisse dénaturée dans un beurre normal).

On pourrait sans doute se contenter d'une sensibilité deux, voire trois fois moindre, ce qui évidemment réduirait d'autant les prix de revient de la dénaturation.

Cependant, l'éthoxyquine, traceur analytique, peut être considéré également en pratique, si on dispose d'une lampe U.V., comme traceur visuel.

Ce traceur visuel que nous appellerons semi-immédiat puisque c'est un tra-

ceur par fluorescence, est plus sensible comme traceur visuel que les chlorophylles.

En conséquence, nous ne croyons guère que le choix d'une chlorophylle commerciale soit d'un grand intérêt, et doit être maintenu comme traceur visuel immédiat, étant donné que cette mission est aussi bien et même mieux remplie par l'éthoxyquine, à condition de disposer d'une simple lampe U.V., émettant vers 360 nm, appareil peu coûteux dont tous les laboratoires peuvent être équipés.

Si on objecte que le pouvoir traceur visuel semi-immédiat de l'éthoxyquine peut être facilement enlevé par une technique très simple, on peut répondre qu'il en est de même du pouvoir traceur visuel des chlorophylles par une autre technique.

Enfin, nous croyons bon d'insister encore une fois sur le fait que les produits de dégradation de l'éthoxyquine, même après traitement des corps gras par des solutions aqueuses acides, ne sont pas totalement éliminables de ceux-ci et qu'on peut les retrouver analytiquement, si la graisse dénaturée à raison de 150 grammes/tonne et traitée est diluée dans un beurre normal avec une dilution théoriquement infinie (il suffit d'extraire les dérivés de l'éthoxyquine d'un échantillon suffisamment grand par l'aleool et de les concentrer suffisamment) et pratiquement certainement inférieure à 1% et de l'ordre de 0,1%.

Si la CEE, pour certaines raisons qui lui sont propres, décidait de maintenir les chlorophylles ou leurs dérivés comme traceurs, elle aurait aussi à en définir la nature chimique. Dans ce cas, nous signalons la difficulté qui pourrait surgir avec l'emploi de phéophytines, celles-ci n'étant pas reprises dans la liste des colorants officiellement admis par la Directive du Conseil du 11/11/62 modifiée en dernier lieu par la Directive du Conseil du 13/7/70.

3. Utilisations comparées du miglyol 812 et de l'huile de colza en tant que traceurs de la matière grasse butyrique

Les possibilités d'utilisation comme traceur de cette huile naturelle (huile de colza) ou de cette huile extraite de corps gras naturels (miglyol 812) ont été examinées principalement en fonction, outre de leur caractère naturel, de leurs qualités essentielles pour un traceur:

- a) une élimination des corps gras impossible par des techniques économiques;
- b) des qualités analytiques indéniables (compositions en acides gras particulières parmi les corps gras).

Le tableau synoptique 3.1. résume brièvement les principales caractéristiques des produits examinés et donne pour comparaison une synthèse des essais effectués et de leurs résultats.

Remarques: La dénaturation de la graisse butyrique par le miglyol 812 et l'huile de colza au point de vue économique.

Pour les cinq traceurs étudiés ci-avant, le sésamol, la vanilline, le bêta sitostérol, les chlorophylles et l'éthoxyquine, introduits en quantité peu importantes dans le beurre (0,1 à 0,3%), les prix commerciaux des quantités ajoutées par tonne de corps gras constituaient approximativement le coût de la dénaturation.

Il n'en est plus de même pour le miglyol et l'huile de colza qui devraient être introduits en quantités relativement conséquentes dans la graisse butyrique à dénaturer.

Ces traceurs se substitueraient à environ 3% en poids de graisse butyrique.

Pour obtenir le prix de revient de la dénaturation par tonne de corps gras, il sera donc nécessaire de retirer du prix du traceur, le prix commercial de la quantité correspondante de la matière grasse butyrique avant dénaturation.

Si on effectue ce calcul, on s'aperçoit que le prix de revient de la dénaturation par le miglyol, sans être économique, peut être acceptable, tandis que la dénaturation par l'huile de colza serait même une source de bénéfices.

Pareille source de bénéfices est évidemment non désirable et pour éviter toute spéculation à ce sujet, les méthodes d'analyse devront donc être suffisamment précises pour contrôler dans les limites nécessaires, le taux d'huile de colza à introduire éventuellement comme traceur dans la matière grasse butyrique.

3.1. <u>Tableau synoptique</u>	<u>Huile de colza</u>
<u>Miglyol 812</u>	Huile alimentaire
Miglyol 812: Triglycérides d'acides à chaîne moyenne	Nombreux pays dont la C.E.E.
Allemagne R.F.	40 - 50% C22:1 (1% max C22)
ca 58% C8 (ca 40% C10)	env. 10,5 U.C. (1970)
env. 52 U.C. (voir remarque ci-dessus)	néant
Chrom. gaz. des esters méth. des acides gras (C6/C8)	Chrom. gaz. des esters méth. des acides gras (C22/C22:1) et éventuellement des stérois (présence de phytostérois)
néant	Facile par chromatographie gaz.
Facile par chromatographie gaz.	Facile par chromatographie gaz
Problématique	Facile par chromatographie gaz
Non possible	Problématique par l'analyse des ac. gras (voir 5) Difficile par l'analyse des stérois.
Non possible	

Caractères principaux examinés

1. Produit commercial

- 1.1. Firmes productrices
- 1.2. Pureté en traceur utile
- 2. Prix du traceur à la dose de 3% (30 kg/tonne)

3. Tests et mise en évidence de la dénaturation

- 3.1. Tests rapides
- 3.2. Méthodes analytiques

4. Possibilité de mise en évidence de:

- 4.1. la graisse butyrique dénaturée pure
- 4.2. 10% de graisse dénaturée dans un beurre normal
- 4.3. 5% de graisse dénaturée dans un beurre normal
- 4.4. 2% de graisse dénaturée dans un beurre normal

<p>5. <u>Inconvénients éventuels</u></p> <p>5.1. Inconvénients de caractère théorique</p> <p>5.2. Inconvénients de caractère analytique</p> <p>5.3. Inconvénients de caractère économique</p>	<p>Présence de laits de chèvres ou de brebis (inconvenient très limité)</p> <p>Méthode rapide avantageuse</p> <p>Prix relativement élevé</p>	<p>Régime alimentaire spécial des vaches laitières (Inconvénients limités cf 4)</p>
<p>6. <u>Possibilités pratiques et économiques d'élimination du traceur</u></p>	<p>Néant</p>	<p>Néant</p>
<p>7. <u>Dose de traceur nécessaire en raison:</u></p> <p>a) des possibilités analytiques</p> <p>b) de l'influence du régime alimentaire sur la composition des ac. gras du lait</p> <p>7.1. Dose de traceur souhaitable</p>	<p>10% (dose trop élevée, non acceptable)</p> <p>-</p>	<p>2% (dose acceptable)</p> <p>2,5%</p> <p>2,5 à 3%</p>

3.2. Conclusions

a) L'utilisation du miglyol comme traceur de la matière grasse butyrique

Le miglyol 812, ne peut être retenu comme traceur valable de la matière grasse butyrique, car trop peu sensible et trop coûteux. Il en serait de même du miglyol 810 ou de tout corps gras qui serait utilisé comme traceur de la graisse butyrique sur la base d'une teneur élevée en un acide pair saturé de C4 à C20, car la matière grasse du beurre contient toujours une proposition notable et variable de ces différents acides gras.

b) L'utilisation de l'huile de colza comme traceur de la matière grasse butyrique

L'huile de colza peut constituer un bon traceur de la matière grasse butyrique. Si elle est préconisée un jour en tant que tel, nous estimons qu'il faut tenir compte des remarques suivantes:

1. L'huile de colza utilisée comme traceur doit être définie quant à sa teneur en acide érucique: le taux d'acide érucique doit être supérieur à 40% des acides gras.

On peut éventuellement la définir également quant à son origine, mais celle-ci est pratiquement incontrôlable.

2. Nous recommandons de fixer la dose de traceur de 2,5 à 3% afin d'obtenir une sensibilité suffisante et de permettre un contrôle aisé.
3. Un contrôle efficace sera basé sur les proportions relatives des acides C22 et C22:1, le taux de C22 étant toujours supérieur au taux de C22:1 dans le beurre, même si le régime alimentaire des vaches contient des proportions normales de tourteaux de colza d'extraction.
Dans les cas litigieux, l'analyse des stérols sera toujours un recours valable.
4. L'huile de colza (comme d'ailleurs le miglyol) étant constituée de triglycérides, aucune méthode économiquement praticable, ne pourra l'extraire du beurre.

4. Conclusions générales

4.1. Conclusions relatives aux traceurs étudiés

Dans cette étude, nous avons traité de la dénaturation de la matière grasse butyrique par un total de sept traceurs.

Parmi ces sept traceurs, cinq, à savoir le sésamol, la vanilline, le bêta sitostérol, la chlorophylle E 140, l'éthoxyquine faisaient ou font encore l'objet d'une réglementation communautaire.

Suite à une courte étude préalable, nous avons choisi nous-mêmes d'examiner deux autres traceurs parmi les triglycérides naturels, le miglyol 812 et l'huile de colza.

De nos recherches, il ressort tout d'abord que deux traceurs "communautaires" au moins doivent être éliminés, à savoir la ou les chlorophylles et la vanilline.

En effet, la ou les chlorophylles commerciales, produits d'ailleurs souvent mal définis, sont trop peu sensibles ou trop coûteux à l'emploi comme traceurs, et sont économiquement éliminables. La vanilline est très aisément éliminable d'une matière grasse butyrique.

A notre sens, il est souhaitable d'éliminer également un troisième traceur préconisé par la C.E.E., à savoir le sésamol, car ce dernier est extractible dans les corps gras, dans des conditions à peine plus sévères que celles demandées par la vanilline.

Les deux autres traceurs, préconisés par la C.E.E., l'éthoxyquine et le bêta sitostérol sont à notre avis des traceurs valables, quoique à des degrés divers.

L'éthoxyquine n'est certainement pas le traceur idéal, puisqu'industriellement, dans des conditions sévères il est vrai, on peut l'éliminer pratiquement totalement des corps gras et qu'on est amené à rechercher ses produits de dégradation dans les beurres dénaturés. Cependant sa sensibilité en tant que traceur, la simplicité des méthodes de dépistage, et le prix de revient de la dénaturation sont tels que nous croyons que ce serait une erreur de la rejeter.

Le bêta sitostérol est un excellent traceur, certainement le meilleur de ceux que nous avons étudiés jusqu'à présent. Il n'a que de très légers inconvénients, issus d'une part du fait qu'il est le stérol principal des huiles alimentaires végétales et, d'autre part, que ses techniques de dépistage sont coûteuses, relativement à celles utilisées pour les autres

traceurs. Les bêta et gamma sitostérols sont deux isomères non ordinairement séparables en chromatographie. Nous souhaiterions que les sitostérols utilisés comme traceurs soient définis par les règlements de la C.E.E. comme les 24 b et (ou) a éthyl cholestérol.

Parmi les deux traceurs choisis parmi les triglycérides naturels, le mi-glycol 812 n'est certainement pas un traceur valable car ses effets sont trop peu sensibles; en outre, il serait relativement coûteux.

L'huile de colza par contre ferait certainement un très bon traceur, car on peut trouver remède aux quelques inconvénients mineurs qu'elle possède. En tout état de cause, l'huile de colza serait un traceur meilleur que les chlorophylles, le sésamol, la vanilline et même que l'éthoxyquine.

4.2. Conclusions relatives au problème général de la dénaturation de la matière grasse butyrique à l'aide de traceurs

Suite à l'exécution de cette étude et aux résultats enregistrés, une question capitale peut être posée. Peut-on envisager le problème de l'écoulement des excédents de beurre de la C.E.E. par la dénaturation à l'aide de traceurs?

Sans aucun doute, nous serons affirmatifs, puisque nous avons vérifié par notre étude qu'on pouvait disposer d'un traceur excellent, les 24 b et (ou) a éthyl cholestérols, autrement dit, les bêta et gamma sitostérols.

Nous disposons en outre de deux traceurs très valables, l'éthoxyquine et l'huile de colza.

Par ailleurs, il existe certainement d'autres traceurs valables mais il faut les rechercher avec une méthode et, le choix effectué, il est nécessaire de les tester.

En vue de leur recherche, on se réfèrera le plus souvent possible à la composition de la graisse de beurre et à celle des corps gras naturels: on essaiera de mettre en évidence un élément présent dans la seconde et absent dans la première. C'est d'ailleurs ainsi qu'on a choisi le bêta sitostérol comme traceur et que l'on pourrait envisager le choix de l'huile de colza pour sa haute teneur en acide érucique.

a) La composition des acides gras et les traceurs possibles de la matière grasse butyrique

Nous avons considéré comme base de la détermination d'un traceur, la mise en évidence d'un acide pair saturé (C8) et d'un acide pair insaturé (C22:1).

Nous avons montré que l'utilisation d'un acide saturé pair de C4 à C22 n'était guère praticable dans le cas qui nous préoccupe. Il en serait d'ailleurs de même de la plupart des acides insaturés.

Cependant, il existe également dans les corps gras, principalement les graisses d'origine animale, des acides impairs et des acides ramifiés. On les rencontre sans doute généralement à des doses minimales, mais il n'empêche qu'on doit les considérer quand même comme des acides naturels. Le grand inconvénient des acides impairs réside dans le fait qu'il ne sera généralement pas possible de les extraire économiquement de produits naturels; par contre, on pourra certainement les produire par synthèse.

Après tout, la vanilline et le sésamol utilisés comme traceurs ne sont-elles pas des substances de synthèse.

Il nous faut donc en premier lieu prendre contact avec l'industrie des corps gras, pour connaître dans quelle mesure, elle pourrait nous fournir économiquement des acides gras impairs, naturels ou synthétiques, ou mieux, car les acides libres sont éliminables des corps gras, des glycérides d'acides impairs.

Actuellement, nous sommes en relation avec certains industriels et ceux-ci ont promis de mettre à notre disposition, à un prix économique, des triglycérides de l'acide énanthique (C7) à une pureté commerciale de 98%.

Nous avons l'intention d'expérimenter une telle substance comme traceur de la matière grasse butyrique.

D'ores et déjà, nous pouvons croire que les triglycérides de l'acide énanthique seront un excellent traceur, puisqu'il n'y a pas plus d'acide énanthique (C7) dans le beurre que d'acide érucique (C22:1).

Cependant, une méthode de dépistage des beurres tracés, basée sur la détermination de l'acide saturé (C7) aurait deux avantages immenses sur une méthode analogue mais basée sur la détermination de l'acide C22:1.

Premièrement, on n'aurait pas à craindre quelque influence du régime alimentaire sur la teneur en acide énanthique du lait, et deuxièmement, les méthodes de dépistage seraient encore rendues plus simples, plus économiques et plus efficaces.

L'acide énanthique devra être inclus dans un triglycéride, car en tant qu'acide libre, on l'éliminerait facilement des beurres. Dans ce cas, certains pourront peut-être objecter qu'il ne s'agit plus d'une substance naturelle; alors nous faudra-t-il sans doute démontrer l'innocuité

biologique de ce produit et la faire admettre par les services compétents en matière d'hygiène et de santé publique dans les divers pays de la C.E.E.

Naturellement, les glycérides de l'acide énanthique ne sont pas les seuls auxquels on pourrait penser comme traceurs possibles du beurre. Il y a aussi les glycérides des acides valérique (C5) et pèlargonique (C9) et probablement aussi des glycérides d'acides ramifiés; l'utilisation de ceux-ci posant les mêmes problèmes que l'utilisation de l'acide énanthique, on peut croire qu'un résultat positif dans les recherches concernant ce dernier, ira de pair avec un résultat positif pour les recherches qu'on entreprendrait alors à propos des autres acides impairs ou acides ramifiés.

b) La composition des glycérides et les traceurs possibles de la matière grasse butyrique

La matière grasse butyrique est composée d'une foule de triglycérides dont la séparation, quoique imparfaite, est possible en chromatographie gazeuse.

On sait pourtant qu'il n'y a pas de tributyrine dans le beurre.

Peut-être est-il possible de choisir une telle substance comme traceur, ou éventuellement un autre triglycéride, un diglycéride et même un monoglycéride?

c) La composition de l'insaponifiable et les traceurs possibles de la matière grasse butyrique

Nous savons déjà qu'on peut utiliser les phytostérols (exemple: les sitostérols) comme traceurs du beurre. L'utilisation des phytostérols est encore une fois subordonnée à leur disponibilité commerciale pour un prix de revient acceptable.

Le stigmastérol serait probablement un traceur meilleur encore que les sitostérols, mais il existe d'autres stérols végétaux ou stéroïdes disponibles.

Enfin, l'insaponifiable contient encore une foule de composés qui pourraient être étudiés avantageusement: nous noterons principalement les hydrocarbures, les tocophérols et les vitamines liposolubles ou des isomères non biologiquement actifs.

Il est bon de citer également, la sésamoline, composé bicyclique contenant du sésamol, mais qui à l'opposé de celui-ci, est difficilement éliminable des corps gras par les procédés modernes de raffinage.

Enfin, l'étude de certains additifs ou de certains antioxydants pourrait être envisagée quoique ceux-ci en général sont éliminables des corps gras par la vapeur, sous pression réduite (stripping).

4.3. Les voies possibles, dans un avenir immédiat, pour la recherche en matière de dénaturation de beurres à l'aide de traceurs

Les brèves considérations ci-dessus, concernant le choix possible de traceurs pour la matière grasse butyrique, montrent à souhait l'amplitude et la complexité de ce problème.

Ce problème est vaste, car on peut trouver de nombreuses substances naturelles ou de synthèse qui sont solubles dans les corps gras et qui font partie intégrante de la matière grasse, au point de ne pas être économiquement dissociables.

Ce problème est complexe, car ces substances doivent être commercialement disponibles à un prix économique.

On doit pouvoir les doser ou du moins les dépister économiquement avec les méthodes d'analyse actuellement en usage dans les laboratoires d'analyse des corps gras.

S'il s'agit de substances de synthèse, non naturelles ou d'usage non alimentaire, leur innocuité biologique devra sans doute être démontrée.

La solution d'un tel problème ne peut être rapide et ne saurait sans doute être définitive et parfaite. Le traceur idéal n'existe probablement pas, de même qu'il n'existe pas d'antibiotique ou d'antioxydant idéal.

Il est cependant patent qu'en choisissant pour l'écoulement d'une bonne partie des excédents de graisse butyrique, la voie de la dénaturation par traceurs, la C.E.E. n'a pas fait fausse route. Toutefois, il reste beaucoup à étudier et à expérimenter dans ce domaine.

Il serait souhaitable tout d'abord de parfaire les techniques d'analyse et de continuer certaines recherches afin d'éluider complètement la question de l'influence du régime alimentaire sur la teneur en acide érucique de la graisse butyrique.

Il faudrait également entreprendre dès que possible l'étude de la dénaturation des beurres par des triglycérides des acides impairs (l'acide énanthique en particulier) et aborder ensuite l'étude des glycérides en général et celui des composés de l'insaponifiable des corps gras alimentaires.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
I. LE SESAMOL	1
Note préalable	1
1. Propriétés générales du sésamol	2
2. Méthodes analytiques de détermination du sésamol dans les graisses	3
2.1. Méthode officielle belge	4
2.1.1. Description de la méthode	4
2.1.2. Application de la méthode à différents mélanges de matière grasse butyrique contenant des doses croissantes de sésamol	4
2.2. Test de Villavecchia modifié de façon à accroître sa sensibilité	6
2.2.1. Description de la méthode	6
2.2.2. Application du test modifié à la détermination des concentrations en sésamol dans la graisse butyrique	6
2.3. Méthode de dosage du sésamol dans les eaux de lavage de la matière grasse	7
2.3.1. Description de la méthode	7
2.4. Réaction de Villavecchia appliquée sur les spots de sésamol séparés par chromatographie en couche mince	7
2.4.1. Méthode	7
2.4.2. Sensibilité	8
3. Techniques d'extraction du sésamol de la matière grasse	9
3.1. Coefficient de partage du sésamol entre la graisse et l'eau	9
3.2. Coefficient de partage du sésamol entre la graisse et l'alcool à 95%	9
3.3. Extraction du sésamol par une solution de potasse alcoolique	10
3.4. Extraction du sésamol par les solutions aqueuses alcalines	10
3.4.1. Caractère faiblement acide des solutions de sésamol	10
3.4.2. Procédés analytique d'extraction du sésamol	11

3.4.3. Extraction du sésamol par l'eau ammoniacale	11
3.4.4. Extraction du sésamol par des solutions aqueuses de Na ₂ CO ₃	11
3.4.5. Extraction du sésamol par des solutions aqueuses diluées de soude	12
4. Elimination du sésamol de la matière grasse	12
4.1. Elimination du sésamol par les solvants	12
4.1.1. Elimination du sésamol par des solutions diluées de Na ₂ CO ₃	13
4.1.2. Elimination du sésamol par des solutions diluées de soude	13
4.2. Elimination du sésamol par l'action de la température à pression atmosphérique	14
4.2.1. Essais	15
4.2.2. Résultats	15
4.3. Elimination du sésamol par jets de vapeur à haute température sous vide poussé ("stripping")	16
5. Substitution du sésamol par l'huile de sésame	18
II. LA VANILLINE	20
1. Définition et propriétés générales de la vanilline	20
1.1. Contrôle de la pureté des cristaux de vanilline	20
2. Test organoleptique de la présence de vanilline dans les beurres	21
2.1. Expertises organoleptiques	21
3. Techniques de détermination de la vanilline dans une matière grasse	23
3.1. Test rapide à la 2-4 dinitrophénylhydrazine	24
3.2. Méthode colorimétrique de Fitelson (réaction à l'indol) applicable au dosage de la vanilline dans les eaux de lavage	25
3.3. Chromatographie en couche mince	27
3.3.1. Méthode	27
3.3.2. Sensibilité	27

3.3.3. Extraction de la vanilline d'une matière grasse dans un but analytique	27
3.3.4. Sélectivité de la méthode de détermination de la vanilline par le test à la benzidine appliqué en chromatographie en couche mince	30
4. Extraction de la vanilline par des solutions aqueuses et alcooliques neutres ou alcalinisées	30
4.1. Extraction de la vanilline d'une matière grasse par l'eau chaude	30
4.2. Extraction de la vanilline d'une matière grasse par l'alcool à 95% ou la potasse alcoolique	30
4.3. Extraction de la vanilline d'une matière grasse par des solutions aqueuses alcalines	31
4.3.1. Extraction par des solutions aqueuses de soude et de carbonate de soude	31
4.3.2. Extraction par l'eau ammoniacale	31
5. Techniques d'élimination de la vanilline de la matière grasse	32
5.1. Elimination par des solvanats	32
5.1.1. Essais semi-industriels d'extraction de la vanilline par lavages répétés au carbonate de soude	33
5.1.2. Elimination de la vanilline des matières grasses tracées par lavages répétés à l'eau ammoniacale	34
5.2. Elimination de la vanilline par élévation de la température	34
5.2.1. Elévation de la température sous pression ordinaire	34
5.2.2. Elévation de la température sous vide poussé "stripping"	36
5.3. Elimination de la vanilline par entraînement à la vapeur	36
III. LE BETA SITOSTEROL	37
1. Définition et propriétés générales	37
2. Sitostérols commerciaux	38
2.1. Propriétés renseignées du sitostérol "D.R.T."	38
2.2. Contrôle du sitostérol "D.R.T."	38

3. Méthodes analytiques de détermination des sitostérols dans la matière grasse	39
3.1. Point de fusion des acétates de stérols et morphologie des cristaux de cholestérol et de phytostérols	39
3.2. Chromatographie sur couche mince des acétates de stérols	40
3.3. Chromatographie gazeuse des acétates de stérols	41
3.4. Chromatographie gazeuse des stérols	46
4. Analyse des stérols des beurres dénaturés au sitostérol "D.R.T."	47
4.1. Dosage des stérols totaux	47
4.2. Point de fusion des acétates de stérols et analyse microscopique	48
4.3. Analyse qualitative des acétates de stérols par chromatographie gazeuse	48
5. Elimination des sitostérols de la matière grasse butyrique	50
5.1. Elimination des sitostérols par élévation moyenne des températures sous pression ordinaire	50
5.2. Elimination des sitostérols par l'action de hautes températures sous pression réduite ("stripping")	51
5.2.1. "Stripping" en laboratoire	51
6. Emploi des sitostérols comme traceurs de la matière grasse butyrique et mise en évidence de corps gras d'origine végétale	53
IV. LES CHLOROPHYLLES	55
1. Définition et règlement communautaire	55
2. Propriétés physiques des chlorophylles a et b	55
3. Les chlorophylles industrielles	57
4. Les chlorophylles commerciales	57
4.1. Les chlorophylles hydrosolubles	57
4.1.1. Les chlorophylles cuivriques hydrosolubles	57
4.1.2. Les chlorophylles non cuivriques hydrosolubles	58
4.2. Les chlorophylles liposolubles	58
4.2.1. Les chlorophylles non cuivriques liposolubles	58
4.2.2. Les chlorophylles cuivriques liposolubles	58

5. Les chlorophylles liposolubles et leurs dérivés	58
a. Phéophytines	59
b. Chlorophyllides	59
c. Phéophorbides	59
d. Chlorophyllines	59
e. Chlorophylles au cuivre, zinc etc...	59
6. Les chlorophylles liposolubles commerciales	60
6.1. Analyse d'une chlorophylle commerciale dite "E 140"	60
6.1.1. Titre	60
6.1.2. Le spectre d'absorption	63
6.1.3. Le spectre de fluorescence	63
6.1.4. Séparation des pigments par chromatographie sur couche mince	63
6.2. Synthèse des résultats analytiques et conclusions	64
7. Dosage des chlorophylles et des phéophytines	65
7.1. Détermination du titre par le dosage de l'azote	65
7.2. Dosage par spectrométrie d'absorption	65
7.3. Dosage par fluorimétrie	67
8. Stabilité de la chlorophylle commerciale E140	68
9. La chlorophylle commerciale E 140 en tant que colorant des corps gras alimentaires	68
9.1. Les phéophytines en tant que traceur immédiat	68
9.2. Test de la présence de phéophytines par fluorimétrie	70
9.1.2. Examen direct	70
9.2.2. Examen indirect	70
10. Possibilités analytiques de dosage des dérivés chlorophylliens par fluorimétrie	71
10.1. Modalités techniques	72
11. Possibilités d'élimination des chlorophylles commerciales des beurres	73
11.1. Action de la lumière	73
11.2. Action de la chaleur et de l'oxydation	73
11.3. Action des hautes températures sous vide poussé	74

11.4. Action des solvants	74
11.5. Filtration sur charbon actif	74
12. Les chlorophylles cuivriques liposolubles	74
12.1. Les chlorophylles commerciales, leur titre et les exigences de la législation	74
12.2. Quelques analyses élémentaires	75
a. le spectre d'absorption	75
b. la chromatographie sur couche mince	75
12.3. Les chlorophylles cuivriques liposolubles en tant que colorants des corps gras alimentaires	78
12.3.1. Sensibilité du test visuel immédiat	78
12.3.2. Dosage des chlorophylles cuivriques dans les graisses	79
12.3.3. Elimination des chlorophylles cuivriques dans les graisses	79
13. Conclusions	
L'emploi des chlorophylles en tant que traceurs de la matière grasse butyrique	80
V. L'ETHOXYQUINE OU SANTOQUIN	83
1. Définition et propriétés générales	83
2. Analyse de l'Ethoxyquine commerciale	84
2.1. Le spectre de fluorescence	84
2.2. La chromatographie sur couche mince	84
2.3. Dosage et contrôle de l'éthoxyquine commerciale à 100% par spectrométrie U.V.	87
2.3.1. Dosage direct après mise en solution aqueuse acide	87
2.3.2. Dosage indirect après extraction de l'éthoxyquine dans un solvant organique par des solutions aqueuses acides	88
3. Méthodes de dosage de l'éthoxyquine dans les corps gras	90
3.1. Spectrométrie	90
3.2. Fluorimétrie	90
3.2.1. Méthode et sensibilité	90
3.2.2. Dosage dans les corps gras	91
4. L'éthoxyquine employée en tant que traceur des corps gras	92
4.1. L'éthoxyquine, traceur semi-immédiat	92
4.2. L'éthoxyquine, traceur analytique	93

5. Dégradation de l'éthoxyquine dans les matières grasses	93
5.1. Action de la chaleur et de l'oxydation	93
6. Tests de mise en évidence de l'éthoxyquine ou de ses dérivés	95
6.1. Mesure de la fluorescence dans le méthanol	95
6.2. Chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques	96
7. Techniques d'élimination de l'éthoxyquine des corps gras	97
7.1. Action de la vapeur et du vide à haute température ("stripping")	97
7.2. Lavage des corps gras par solutions aqueuses acides	98
7.3. Elimination de l'éthoxyquine et des dérivés des chlorophylles au cours des opérations industrielles conduisant à la fabrication d'aliments pour bétail	100
8. Conclusions	100
8.1. L'emploi de l'éthoxyquine en tant que traceur de la matière grasse butyrique	100
8.2. L'emploi simultané des dérivés des chlorophylles et de l'éthoxyquine en tant que traceurs de la matière grasse butyrique	101
VI. LES TRIGLYCERIDES NATURELS	103
Note préalable: choix des traceurs	103
VI 1. LE MIGLYOL 812	105
1. Composition et propriétés générales	105
2. Le miglyol 812 en tant que traceur de la matière grasse butyrique	105
2.1. Dose de traceur	105
2.2. Sensibilité du traceur	106
Conclusions	108
VI 2. L'HUILE DE COLZA	
1. Composition et propriétés générales	110
2. L'huile de colza en tant que traceur de la matière grasse butyrique	111
2.1. Pouvoir traceur des différentes huiles de colza	111

2.2. Dose de traceur	112
3. Problèmes soulevés par le choix de l'huile de colza en tant que traceur de la matière grasse butyrique	114
3.1. Influence de régimes alimentaires contenant des tourteaux de colza sur la proportion d'acide érucique dans la matière grasse du lait de vaches	114
3.1.1. Expérimentation	114
3.1.2. Conclusions	117
3.2. Problème économique relatif au prix de l'huile de colza	118
3.3. Problème relatif aux qualités diététiques et au goût de l'huile de colza	119
3.4. Problèmes relatifs aux techniques analytiques	119
B. SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	121
1. Utilisations comparées du sésamol, de la vanilline et des sitostérols en tant que traceurs de la matière grasse butyrique	121
1.1. Tableau synoptique	122
1.2. Conclusions	125
1.2.1. Observations relatives à l'utilisation de chaque traceur	125
a. le sésamol	125
b. la vanilline	127
c. le sitostérol	128
1.2.2. Comparaison entre les aptitudes respectives de chaque produit en tant que traceur	129
2. Utilisations comparées des chlorophylles et de l'éthoxyquine en tant que traceurs de la matière grasse butyrique	130
2.1. Tableau synoptique	131
2.2. Conclusions	134
2.2.1. Observations relatives à l'utilisation de chaque traceur	134
a. les chlorophylles	134
b. l'éthoxyquine	136
2.2.2. Observations relatives à l'utilisation simultanée de chlorophylle et d'éthoxyquine comme traceurs	137
3. Utilisation comparées du miglyol 812 et de l'huile de colza en tant que traceurs de la matière grasse butyrique	138

3.1. Tableau synoptique	140
3.2. Conclusions	141 b
4. Conclusions générales	142
4.1. Conclusions relatives aux traceurs étudiés	142
4.2. Conclusions relatives au problème général de la dénatura- tion de la matière grasse butyrique à l'aide de traceurs	143
4.3. Les voies possibles, dans un avenir immédiat, pour la recherche en matière de dénaturation de beurres à l'aide de traceurs	146

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 remembrement	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 D en prép.
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(4)
N° 46	La consommation du vin et les facteurs qui la déterminent – RF d'Allemagne	juin 1969	F D
N° 47	La formation de prix du hareng frais dans la Communauté économique européenne	août 1969	F D en prép.
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 en prép.
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 D en prép.
N° 55	Les équipements pour la commercialisation des fruits et légumes frais dans la CEE – RF d'Allemagne, Italie	janvier 1970	F D en prép.

(4) Cette étude n'est pas disponible en langue allemande.

		Date	Langues
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 en prép.
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 en prép.
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 en prép. 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 en prép. 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 en prép.
N° 71	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale VII. Portugal	février 1971	F en prép. D
N° 72	Possibilités et conditions de développement des systèmes de production agricole extensifs dans la CEE	avril 1971	F D en prép.
N° 73	Agriculture et politique agricole de quelques pays de l'Europe occidentale VIII. R. d'Irlande	mai 1971	F en prép. D
N° 74	Recherche sur les additifs pouvant être utilisés comme révélateurs pour la matière grasse butyrique	mai 1971	F D en prép.

