

QUALITAS PLANTARUM
ET
MATERIAE VEGETABILES

Hereditas, Biochimia, Physiologia, Oecologia, Cultura et Praeparatio plantarum
edulium et artibus utilium

Organ of the Confoederatio Internationalis ad Qualitates Plantarum Edulium
Perquirendas (CIQ) and of the International Commission for Plant Raw
Materials

EDITORS:

A. TH. CZAJA, Aachen - L. GENEVOIS, Talence - C. REGEL, Izmir Bornova
W. SCHUPHAN, Geisenheim

L'APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE
EN PHASE GAZEUSE À L'ANALYSE DE
PURETÉ DES CORPS GRAS

E. P. MAGRÉ & F. D. TOLLENAAR

(Institut central de la nutrition et de l'alimentation, T.N.O., Utrecht,
Pays Bas).

(avec 3 figs.)

VOLUMEN XI

UITGEVERIJ DR. W. JUNK - DEN HAAG - 1964

L'APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE À L'ANALYSE DE PURETÉ DES CORPS GRAS

E. P. MAGRÉ & F. D. TOLLENAAR

(Institut central de la nutrition et de l'alimentation, T.N.O., Utrecht,
Pays Bas).

(avec 3 figs.)

Une des tâches du chimiste alimentaire est d'examiner si aucun corps gras de provenance étrangère n'a été ajouté à une graisse ou à un produit gras. Pour cet examen, il lui faut tenir compte de deux possibilités.

L'addition d'un corps gras étranger peut avoir eu lieu involontairement et avoir le caractère d'une impureté. On ne peut généralement dire grand-chose de la nature des additions de ce genre; toutes sortes de graisses peuvent être présentes comme impuretés, le plus souvent en faible quantité.

L'addition peut aussi être intentionnelle, dans le but d'améliorer la qualité du produit alimentaire ou pour y remplacer une matière première relativement coûteuse. Dans un cas donné, il n'y a qu'un nombre limité de corps gras convenant à une telle addition. Aussi pouvons-nous nous figurer d'avance la nature d'une telle addition, ce qui facilite l'analyse.

Pour déceler les additions de graisses étrangères, nous disposons en premier lieu des différents modes de détermination de l'analyse classique. Si l'indice d'iode, l'indice de saponification, le point d'aniline, etc. d'un échantillon diffèrent nettement des caractéristiques correspondantes que l'on constate généralement pour un tel corps gras, ce fait constitue une indication de l'addition d'une graisse étrangère.

Mais une addition ne provoquera pas dans tous les cas une modification évidente des indices. Aussi se peut-il que certains mélanges échappent à notre attention.

Une des ressources modernes de l'analyse des corps gras est offerte par la chromatographie en phase gazeuse. Celle-ci permet la détermination qualitative et quantitative des acides gras constituant d'une graisse. Si l'on dispose non seulement des résultats de l'analyse classique, mais aussi d'une détermination complète des acides gras

constituants, on pourra mieux juger la pureté de la graisse. Pour cela, il faut cependant connaître l'analyse des acides gras de produits non suspects et l'écart naturel possible dans cette composition.

Nous faisons suivre maintenant une brève description de la méthode que nous avons appliquée pour la détermination des acides gras constituant de graisses au moyen de la chromatographie en phase gazeuse.

On fait saponifier environ 100 mg de graisse avec une solution alcaline alcoolique, puis l'on écarte la fraction insaponifiable par extraction à l'éther de pétrole. Après avoir libéré les acides gras, on prépare leurs esters méthyliques à l'aide de diazométhane gazeux selon la méthode de SCHLENK & GELLERMAN (1). Enfin, les esters méthyliques sont dissous dans d'heptane et conservés ainsi. Pour chaque analyse, on injecte environ 0.3 μ l de cette solution contenant environ 30 μ g d'esters méthyliques.

L'appareil à chromatographie en phase gazeuse de la marque Becker utilisé par nous est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Le signal du détecteur est transmis par un électromètre amplificateur Vibron (résistance d'entrée $10^8 \Omega$) à un enregistreur Philips à portée de mesure de $2\frac{1}{2}$ mV. Pour l'analyse des acides gras, nous utilisons des colonnes longues de $1\frac{1}{2}$ m et d'un diamètre de 3.6 mm. Elles sont remplies de presque 6 g de la phase stationnaire, composé de 20 % d'adipate de polyéthylène glycol sur des grains Gaschrom S 100—120 mesh. La température de la colonne est de 180°C. Dans ces conditions, l'on obtient un nombre de plateaux théoriques de 2600 à 2800 pour le stéarate de méthyle. Le temps de rétention du linoléate de méthyle est d'une heure environ.

Les surfaces des pics du chromatogramme sont déterminées au planimètre. Cela se fait avec le plus grand soin. Le poids d'ester méthylique est fixé proportionnellement à la surface du pic en question et le total est fixé à 100 %.

Pour nous faire une idée de l'exactitude atteinte de cette façon, nous allons voir les résultats de plusieurs analyses d'un mélange d'essai de composition connue. Le mélange d'essai comprend 7 composants. (Tableau I).

TABLEAU I

Analyse d'un mélange des esters méthyliques d'acides gras.

esters méthyliques	composition connue %	moyenne de six essais %	écarts quadratiques
8:0	1.55	1.72	0.08
10:0	2.99	3.16	0.09
12:0	5.96	5.97	0.08
14:0	11.96	11.91	0.12
16:0	19.41	19.27	0.10
18:0	24.91	24.81	0.17
20:0	33.19	33.16	0.25

Les écarts des résultats sont faibles et les moyennes trouvées sont en bonne concordance avec la composition connue.

Dans notre étude, notre attention a porté spécialement sur deux graisses, à savoir la graisse de porc et le beurre de cacao.

Beurre de cacao.

Afin de nous faire une idée de la composition en acides gras du beurre de cacao pur, nous avons analysé douze échantillons d'origine sûre. Deux échantillons étaient des beurres du commerce obtenus par pressée; deux autres provenaient de l'extraction de la poudre de cacao en laboratoire et les huit autres provenaient de l'extraction en laboratoire de graines de cacao torréfiées et broyées et de la masse de cacao, provenant de la récolte principale de la Côte-d'Ivoire, du Ghana, de la Nigéria, de Lomé, de Saint-Thomas, d'Arriba (2x) et du Surinam.

L'extraction de 100 g de matière était effectuée avec deux fois 200 ml de chloroforme + méthanol 4 : 1. La matière était mélangée intimement au solvant pendant deux minutes dans un malaxeur électrique du type Turmix. Après évaporation du solvant le résidu a été dissous dans de l'éther de pétrole et filtré après un certain temps de repos.

La fig. 1 montre un chromatogramme caractéristique d'un beurre de cacao d'Arriba.

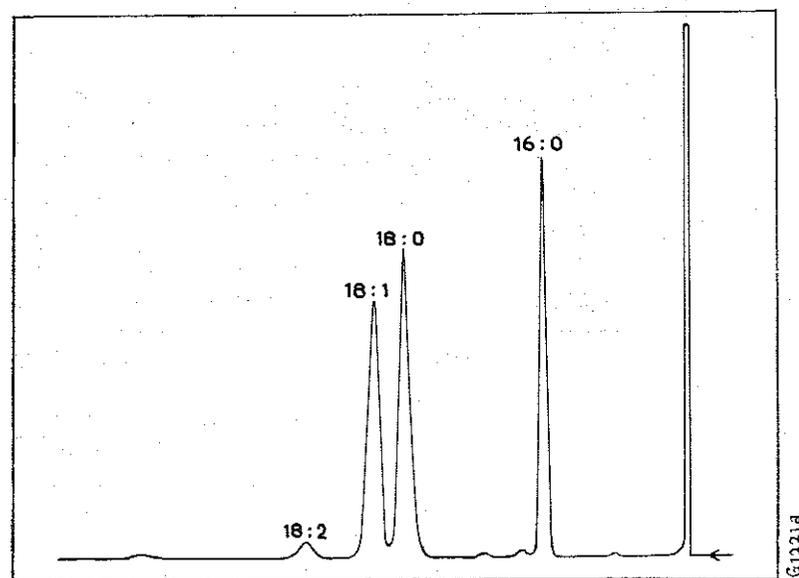


Fig. 1. Chromatogramme des esters méthyliques du beurre de cacao d'Arriba.

Il contient les acides gras suivants: 12 : 0, 14 : 0, 16 : 0, 16 : 1, 17 : 0, 18 : 0, 18 : 1, 18 : 2, 18 : 3, et 20 : 0. Exception faite du beurre de cacao du Surinam, nous trouvons pour les autres échantillons la composition moyenne en acides gras suivante (Tableau II).

TABLEAU II

Composition moyenne d'onze beurres de cacao

acides gras	composition moléculaire %	valeurs extrêmes
12:0	trace	0 — 0.2
14:0	0.2	0.1— 0.3
16:0	27.5	27.1—27.9
16:1	0.4	0.3— 0.5
17:0	0.3	0.2— 0.3
18:0	34.2	33.3—35.6
18:1	33.5	32.3—34.5
18:2	2.9	2.5— 3.2
18:3	0.1	trace — 0.2
20:0	0.9	0.8— 1.1

Les valeurs extrêmes des pourcentages en question sont également indiquées. Il est remarquable combien la somme des acides en C_{16} et celle des acides en C_{18} varient peu. L'acide palmitoléique n'étant présent qu'en faibles quantités et ne variant guère, on pourrait dire que la teneur de ces beurres en acide palmitique est à peu près constante. A mesure que l'indice d'iode augmente, une partie de l'acide stéarique se trouve remplacée par l'acide oléique et peut-être par l'acide linoléique (fig. 2).

Il est également curieux que l'on ne constate pas de différence de la composition en acides gras entre la graisse de la masse torréfiée et broyée extraite en laboratoire et la graisse obtenue par extraction de la poudre de cacao. Il est logique, en ce cas, que le beurre obtenu par pressée ait aussi la même composition.

Le douzième échantillon, le beurre de cacao de Surinam, possède une composition en acides gras différents (Tableau III).

Une part de l'acide stéarique est remplacée par l'acide palmitique. Pour ce qui est du degré de saturation, ce beurre-ci ne se distingue pas des autres échantillons.

En plus de ces douze beurres de cacao de provenance connue, nous en avons étudié neuf autres d'origine inconnue, soit un beurre d'ex-

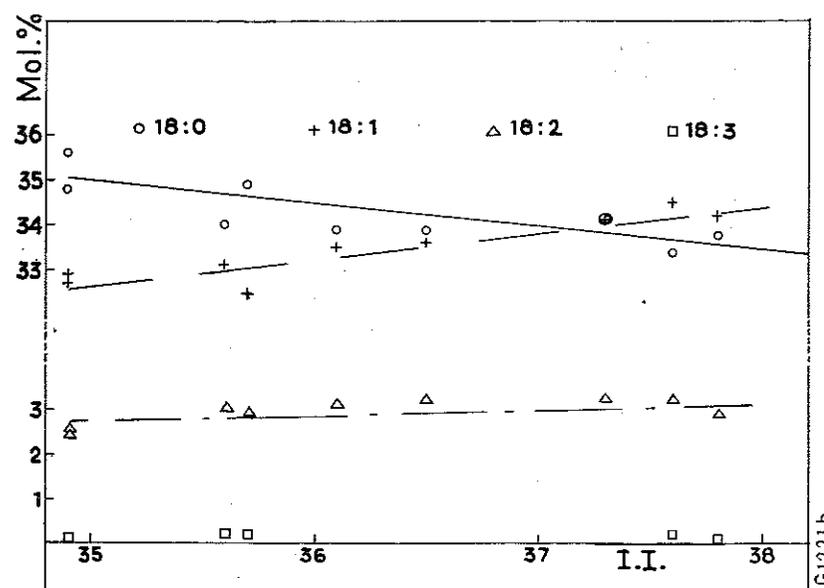


Fig. 2. Relation entre l'indice d'iode et la teneur en acides C₁₈

traction, six beurres de pressée industriels, une graisse extraite de chocolat pur et un succédané de beurre de cacao.

Les deux beurres de pressée étaient à peu près identiques à la moyenne calculée plus tôt; il en était de même pour la graisse extraite du chocolat pur.

La composition en acides gras du succédané en celle du beurre obtenu par extraction s'écartaient de la moyenne calculée auparavant (Tableau IV).

Trois des quatre autres beurres de pressée présentaient un écart de la moyenne ne pouvant s'expliquer à l'aide des données rassemblées jusqu'ici. Enfin, un échantillon présentait un écart dans le sens du succédané analysé.

Même après avoir continué et étendu cette étude, il restera difficile d'apprécier la pureté d'un beurre de cacao en se basant seulement sur la composition en acides gras. Ainsi, la composition en acides gras à elle seule ne permettra guère d'établir une distinction entre un beurre de cacao pur du Surinam et un mélange d'un beurre de cacao „moyen” avec 10 % du succédané que nous avons examiné.

Graisse de porc

Dans différents pays, des quantités assez importantes de graisse de porc servent à la consommation humaine directe. Il arrive que

TABLEAU III

Composition moléculaire d'un beurre de cacao de Surinam, comparée avec la composition moyenne de neuf beurres connus

acides gras	Surinam	comp. moyenne
12:0	—	trace
14:0	0.1	0.2
16:0	30.9	27.5
16:1	0.4	0.4
17:0	0.3	0.3
18:0	31.3	34.2
18:1	33.2	33.5
18:2	2.6	2.9
18:3	0.1	0.1
20:0	1.1	0.9

TABLEAU IV

Composition moléculaire d'un beurre d'extraction et d'un succédané, comparée avec la composition moyenne de neuf beurres connus

acides gras	beurre d'extraction	succédané	comp. moyenne
12:0	—	—	trace
14:0	0.1	0.8	0.2
16:0	24.5	57.1	27.5
16:1	0.5	—	0.4
17:0	0.3	0.4	0.3
18:0	34.6	8.6	34.2
18:1	35.6	30.1	33.5
18:2	3.5	2.2 + 0.7	2.9
18:3	0.1	trace	0.1
20:0	0.8	—	0.9

cette graisse de porc soit mélangée avec de la graisse de boeuf, notamment lorsqu'une différence de prix rend ce mélange avantageux. Mais en général, un tel mélange doit être considéré comme une fraude, de sorte que depuis longtemps, le chimiste alimentaire a dû s'intéresser aux critères de pureté des graisses de porc.

Considérées globalement, les graisses de boeuf et de porc possèdent une composition en acides gras analogue, comme le montre la fig. 3.

En cas de mélange, la composition en acides gras ne subira donc pas de modifications caractéristiques à première vue (nous reviendrons plus tard aux différences essentielles relatives aux acides gras présents en faibles quantités).

Mais la différence est bien considérable en ce qui concerne la

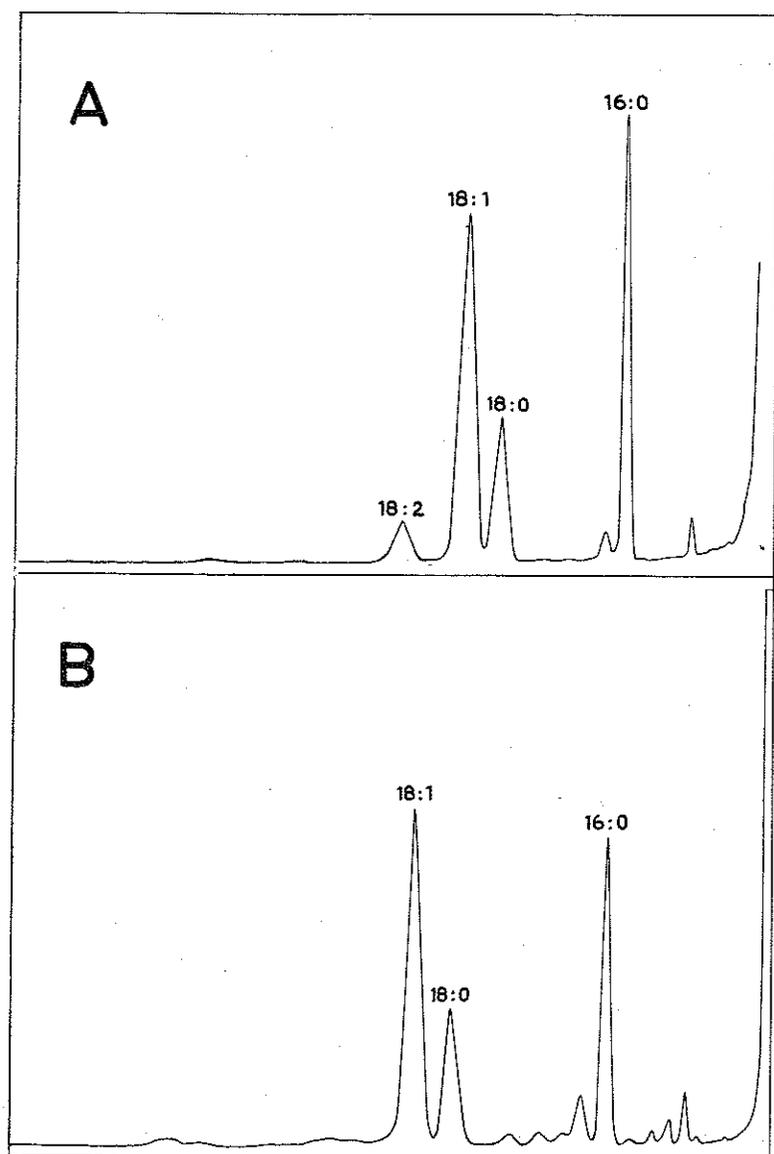


Fig. 3. Comparaison des chromatogrammes des esters méthyliques du saindoux de panne (A) et du suif de boeuf (B).

composition en triglycérides des graisses de porc et de boeuf. Dans la graisse de porc, la fraction des triglycérides saturés se compose pour une part importante de la palmitodistéarine symétrique, tandis

que l'isomère asymétrique domine dans les graisses de boeuf, de mouton, etc. La méthode connue de BÖMER pour la détection de faibles quantités de graisse de boeuf ou de mouton dans la graisse de porc est basée sur ce fait. Selon cette méthode, on isole d'une solution une fraction triglycéridique composée principalement d'acides gras saturés. On détermine le point de fusion de cette fraction, ainsi que celui des acides gras obtenus après sa saponification. A partir de ces chiffres, on calcule une caractéristique de la graisse de porc (indice de BÖMER).

Il existe trois méthodes d'isolation des glycérides de BÖMER à partir de la graisse de porc (Tableau V).

TABLEAU V

Comparaison des trois modes d'obtention des glycérides de BÖMER.

	méthode A.O.C.S.	méthode D.G.F.	méthode R.Z.S.
solvant	l'acétone	l'oxyde d'éthyle	l'oxyde d'éthyle
température de cristallisation	30°C	15°C	15°C
nombre de cristallisation	1	2	2
durée de la cristallisation	18 heures	1 heure 1 heure	1 heure 1 quart d'heure
lavage des cristaux	plusieurs fois	pas de lavage	3 fois 3 fois

1. La méthode A.O.C.S. (2). Cette technique proposée par l'American Oil Chemists' Society utilise l'acétone comme solvant. On isole les glycérides par cristallisation à 30°C. Les glycérides sont lavés plusieurs fois à l'acétone.
2. La méthode D.G.F. (3). Suivant cette méthode standard de la Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft, on isole à deux reprises par cristallisation de l'éther. On ne lave pas les glycérides.
3. La méthode R.Z.S. (4). Cette méthode, mise au point par la Station Nationale de Laiterie à Leyde, est une variante de la méthode D.G.F. Les glycérides séparés par cristallisation sont lavés ensuite à l'éther.

ROOS (4) et TOLLENAAR et al. (5) ont démontré que la détermination de l'indice de BÖMER permet de révéler avec une grande probabilité la présence de 5 % de graisse de boeuf dans la graisse de porc.

Cependant, il est compréhensible que l'on recherche des méthodes plus modernes permettant entre autres de mieux juger du mélange. Signalons sous ce rapport les travaux importants de WOLFF (6), qui a utilisé la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des glycérides de BÖMER aussi bien que pour celle des graisses primitives. WOLFF a constaté que le rapport de 18 : 0/16 : 0 dans les glycérides de BÖMER ne constitue pas un critère exact de la pureté de la graisse de porc.

Il se trouve, que dans les glycérides de BÖMER provenant des graisses de porc pures, ce rapport dépend de toutes sortes de facteurs.

Tout d'abord, il y a l'influence de la méthode d'isolation. Le tableau VI fait voir les compositions en acides de deux glycérides provenant du même saindoux de panne.

Ces glycérides ont été isolés en utilisant quatre fois la méthode A.O.C.S. et quatre fois la méthode D.G.F. Le tableau VII montre la différence entre un glycéride obtenue par application de la méthode A.O.C.S. et un glycéride isolé suivant la méthode R.Z.S.

Les compositions sont à peu près identiques, mais pour la méthode A.O.C.S., la teneur en 18 : 1 est plus élevée de 3 % environ et celle en 18 : 0 plus basse d'autant. Encore il en résulte une différence du rapport 18 : 0/16 : 0.

On trouve aussi des écarts en utilisant exactement le même mode d'isolation, par exemple entre les graisses de porc de provenances

TABLEAU VI

Composition moléculaire de deux glycérides de BÖMER, séparés à partir du saindoux de panne.

mode d'obtention	14:0	16:0	17:0	18:0	20:0	18:0 / 16:0
4 x A.O.C.S.	0.6	37.5	0.4	60.8	0.7	1.62
4 x D.G.F.	0.3	36.4	0.4	62.3	0.6	1.71

TABLEAU VII

Composition moléculaire de deux glycérides de BÖMER, séparés à partir de la graisse de lard

mode d'obtention	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	18:1	20:0	18:0 / 16:0
A.O.C.S.	1.0		38.	0.35	55.1	4.3	0.7	1.43
R.Z.S.	1.0		38.	0.32	59.2	1.2	0.4	1.55

TABLEAU VIII

Composition moléculaires des glycérides de BÖMER, obtenus selon la méthode R.Z.S.

graisse	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	18:1	20:0	18:0 / 16:0
<i>Saindoux</i>								
saindoux de panne	0.9	trace	39.2	0.3	58.5	0.5	0.6	1.49
ratis de porc	0.9	trace	39.8	0.4	57.5	0.6	0.7	1.44
graisse de lard	0.6	trace	37.9	0.4	60.2	0.4	0.5	1.59
<i>Suif de boeuf</i>								
ratis de boeuf	1.9	0.8	28.6	2.5	62.4	3.5	0.3	2.18
gras de rognon	3.2	0.9	33.3	2.3	56.4	3.5	0.4	1.70
graisse adhérente	1.6	1.0	34.3	2.9	58.1	1.7	0.4	1.70

biologiques différentes (Tableau VIII). De plus, le rapport 18 : 0/16 : 0 des glycérides des graisses de boeuf pures diffère relativement peu de celui des glycérides des graisses de porc pures, comme montre le tableau VIII.

On remarque que parmi les glycérides des graisses de boeuf, la teneur en 18 : 1 est assez élevée (peut être par la présence d'acides trans). Il y a plus de 15 : 0 et probablement un peu moins de 20 : 0 que dans les glycérides des graisses de porc.

En concordance avec ce fait, nous avons tenté de déterminer la quantité de graisse de boeuf contenue dans un mélange de graisses de boeuf et de porc en utilisant le rapport 15 : 0/20 : 0 des glycérides de BÖMER.

A la plus haute sensibilité du chromatographe pour analyse en phase gazeuse, nous avons déterminé exactement le rapport de 15 : 0 et 20 : 0 dans les glycérides de BÖMER obtenus de trois sortes de graisse de porc et trois sortes de graisse de boeuf (Tableau IX).

La moyenne de ce chiffre proportionnel pour les glycérides des graisses de porc fut considérée comme 0 % de graisse de boeuf, la moyenne de ce rapport parmi les glycérides des graisses de boeuf étant prise pour 100 % de graisse de boeuf.

Les glycérides de BÖMER ont été isolés à partir de douze mélanges de graisses de boeuf et de porc de composition connue. Ensuite, le rapport 15 : 0/20 : 0 fut déterminé et la proportion de graisse de boeuf ajoutée fut calculée à partir de ce rapport (Tableau X).

Nous croyons avoir réussi à mettre au point de cette façon une méthode permettant la détermination semi-quantitative de la présence de graisses de boeuf dans les graisses de porc. Mais il nous

TABLEAU IX

Rapport moléculaires dans des glycérides de BÖMER, obtenus selon la méthode R.Z.S.

graisse	15:0 / 20:0
<i>Saindoux</i>	
saindoux de panne	0,026
ratis de porc	0,039
graisse de lard	0,027
moyenne	0,031
<i>Suif de boeuf</i>	
ratis de boeuf	1,73
gras de rognon	1,57
graisse adhérente	1,69
moyenne	1,66

TABLEAU X

Analyse de douze mélanges de saindoux et de suif de boeuf à l'aide du rapport 15:0 / 20 : 0 dans les glycérides de BÖMER (méthode R.Z.S.)

Mélange	Quantité de suif de boeuf ajoutée	calculée
saindoux de panne	5.0	4.2
+ graisse adhérente	10.0	9.6
saindoux de panne	5.0	6.0
+ gras de rognon	10.0	12.0
ratis de porc	5.0	3.6
+ graisse adhérente	10.0	7.5
graisse de lard	5.0	6.5
+ graisse adhérente	10.0	12.9
ratis de porc	5.0	5.9
+ gras de rognon	10.0	10.9
graisse de lard	5.0	6.7
+ gras de rognon	10.0	15.5

semble utile d'appliquer notre méthode de la façon recommandée par WOLFF, c'est à dire sur la graisse non fractionnée.

Soulignons enfin que l'analyse par chromatographie en phase gazeuse doit être exécutée avec la plus grande précision. C'est de cette précision que dépend toute la valeur de la méthode de WOLFF aussi bien que celle de la nôtre.

RÉSUMÉ

On peut contrôler la pureté des graisses par la détermination de la composition en acides gras.

Deuze beurres de cacao purs ont été analysés, ainsi que plusieurs beurres de cacao de commerce et un succédané.

Probablement la pureté d'un saindoux peut être jugée par la détermination du rapport de l'acide pentadécanoïque (C₁₅) et l'acide eicosanoïque (C₂₀) dans le glycéride de BÖMER.

SUMMARY

The purity of fats can be verified by the determination of its fatty acid composition.

Twelve pure cocoa butters have been analysed, as well as several commercial cocoa butters and a substitute.

The purity of a lard can be evaluated by the determination of the proportion of pentadecanoic acid (C₁₅) to eicosanoic acid (C₂₀) in BÖMER's glyceride.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung des Gehaltes an Fettsäuren stellt eine gute Kontrolle der Reinheit von Fetten dar.

12 Arten reiner Kakaobutter wurden analysiert, ferner einige handelsübliche Kakaobutterprodukte und ein Kakaoersatzprodukt.

Die Reinheit von Schmalz kann durch Bestimmung des Verhältnisses von Pentadekansäure (C₁₅) zur Eikosansäure (C₂₀) im Glyzerid von BÖMER beurteilt werden.

BIBLIOGRAPHIE

1. SCHLENK, H. & J. L. GELLERMAN, *Anal. Chem.* 32, 1412—1414 (1960).
2. *American Oil Chemists' Society*, Official and Tentative Methods; 2nd Ed. Cb 5—40.
3. *Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft*, DGF-Einheitsmethoden C-VI, 7 (53).
4. ROOS, J. B. *Fette Seifen Anstrichmittel* 64, 6—12 (1962).
5. TOLLENAAR, F. D., H. VAN GEND & H. HOEKMAN, *Fette Seifen Anstrichmittel* 64, 303—308 (1962).
6. WOLFF, J.-P., *Rev. franç. Corps Gras* 8, 677—685 (1961).