



HAL
open science

**LES TECHNIQUES MODERNES D'ANALYSE
(SPECTROSCOPIE, CHROMATOGRAPHIE) AU SERVICE DU
LABORATOIRE DE RECHERCHES SUR LA BIOCHIMIE DES
LIPIDES DU LAIT**

S. Kuzdzal-Savoie

► **To cite this version:**

S. Kuzdzal-Savoie. LES TECHNIQUES MODERNES D'ANALYSE (SPECTROSCOPIE, CHROMATOGRAPHIE) AU SERVICE DU LABORATOIRE DE RECHERCHES SUR LA BIOCHIMIE DES LIPIDES DU LAIT. *Le Lait*, 1965, 45 (445_446), pp.251-262. <hal-00928381>

HAL Id: hal-00928381

<https://hal.science/hal-00928381v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

**LES TECHNIQUES MODERNES D'ANALYSE
(SPECTROSCOPIE, CHROMATOGRAPHIE)
AU SERVICE DU LABORATOIRE DE RECHERCHES
SUR LA BIOCHIMIE DES LIPIDES DU LAIT (1)**

par

S. KUZDZAL-SAVOIE

*Station centrale de recherches laitières et de technologie des produits
animaux, Jouy-en-Josas, France*

La chimie analytique est à la base des études sur la biochimie des lipides du lait et elle a, au cours de ces dernières années, rapidement progressé du fait, en particulier, de l'extraordinaire essor qu'ont connu les méthodes d'analyse basées sur les propriétés physiques des composés. Ces méthodes permettent de déterminer les structures moléculaires dont dépendent le plus souvent les propriétés biologiques des composés.

L'analyse est cependant rarement conduite sur la substance brute. Celle-ci subit auparavant un fractionnement et l'analyse porte sur les fractions obtenues. C'est pourquoi les méthodes de « séparation » ont également une grande importance.

Nous essaierons de montrer ce qu'une méthode de séparation — la chromatographie en phase gazeuse — et une méthode d'identification — la spectroscopie infra-rouge — peuvent apporter au laboratoire de recherches sur la biochimie des lipides du lait.

I. — La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse permet non seulement la séparation des composés mais aussi dans certains cas leur identification et leur dosage.

Nous rappellerons les récents perfectionnements des appareils de chromatographie en phase gazeuse ; nous en verrons ensuite l'utilisation au laboratoire.

A) Récents perfectionnements des appareils de chromatographie en phase gazeuse [1, 2, 3].

Le détecteur à ionisation de flamme s'est très vite répandu durant ces dernières années. Sa sensibilité est environ dix mille

(1) Le même sujet a été traité dans un exposé oral présenté par l'auteur à la réunion du Cercle International des chercheurs laitiers, 3-4 septembre 1963, à Kiel, (Allemagne).

fois plus grande que celle du détecteur à thermoconduction. Ce détecteur convient à l'analyse des composés présents à l'état de traces et ne nécessite en dosage normal qu'une très faible quantité de produit ce qui favorise la séparation. Ce détecteur répond à la plupart des composés organiques (comportant une source de carbone) mais ne répond pas à certains gaz, ni à l'eau. Il est ainsi possible d'injecter directement dans la colonne une solution aqueuse de composés volatils. Le gaz vecteur étant de l'azote, cet appareillage est relativement économique.

Le détecteur à capture d'électrons a une sensibilité plus élevée encore. L'étude des substances halogénées constitue sa principale application. De plus certains composés qui ne «répondent» pas au détecteur à ionisation de flamme, peuvent être décelés par le détecteur à capture d'électrons. Certains appareils récents de chromatographie en phase gazeuse permettent l'utilisation simultanée des deux détecteurs et l'enregistrement simultané des deux chromatogrammes obtenus.

La programmation de température permet d'obtenir une répartition uniforme des pics et une plus grande netteté des pics correspondant aux composés de poids moléculaire élevé. Elle permet également un gain de temps.

L'introduction des colonnes capillaires de Golay (German Patent n° 1063.409) a considérablement amélioré la résolution. Il est ainsi possible avec ces colonnes de séparer des composés absolument indiscernables sur colonne standard, quel que soit le détecteur utilisé.

Parmi les accessoires divers utilisés au cours de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse nous retiendrons l'accessoire de pyrolyse. La pyrolyse est une décomposition thermique non oxydative d'une substance. Il est ainsi possible d'étudier par chromatographie en phase gazeuse, des produits solides non volatils, susceptibles d'être fractionnés par la chaleur. Les plastiques en fournissent un exemple, or ils intéressent parfois l'industrie laitière.

Enfin les appareils de chromatographie préparative permettent de fractionner, généralement de manière automatique, une quantité importante (100 ml par exemple, injectés par fractions de 1 ml) d'un mélange de composés, et de récupérer, également de manière automatique, les composés purs, ou les groupes de composés (si plusieurs composés ont le même volume de rétention sur la colonne utilisée), qui peuvent être ensuite, étudiés avec un appareil de chromatographie en phase gazeuse de plus haute sensibilité ou de plus haut pouvoir de résolution, ou par toute autre méthode d'identification.

B) *Applications de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des lipides du lait.*

Si on la considère comme une méthode de séparation, la chro-

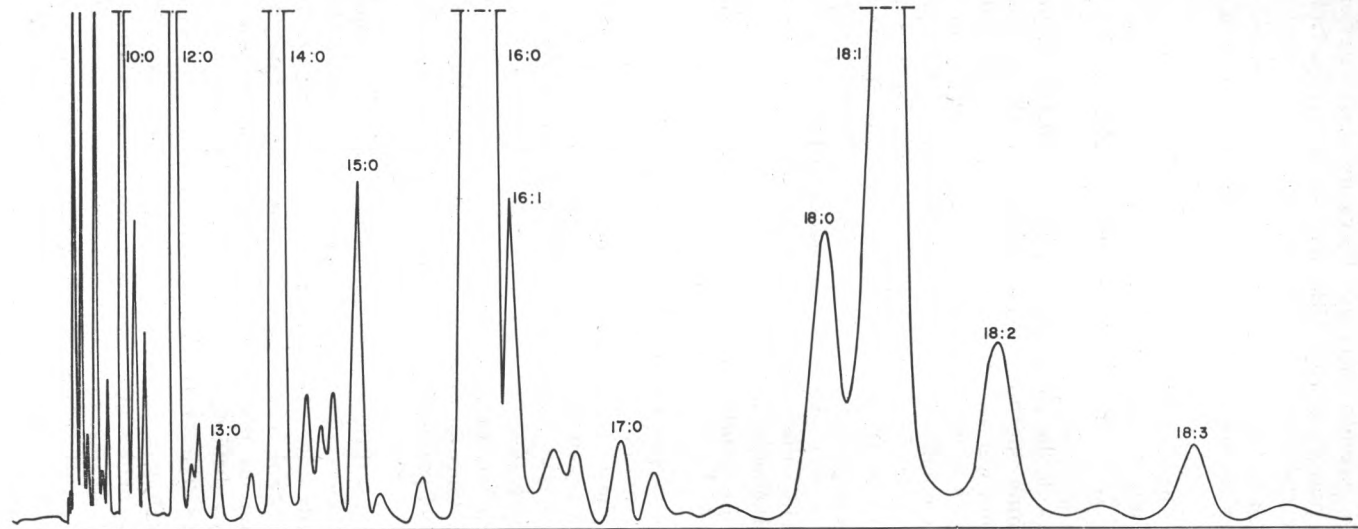


Fig. 1. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras du lait de brebis. (Les résultats ne sont pas quantitatifs pour les acides gras comptant moins de 10 atomes de carbone).
Conditions de l'analyse :

- Appareil Aerograph Hy Fi-650 C ; détecteur à ionisation de flamme.
- Colonne : Diamètre intérieur 0,3 mm (1/8^e de pouce anglais) ; longueur 3,048 m (10 pieds anglais) ; remplie à 10 p. 100 de polyester de Craig (succinate de butanediol) sur brique à feu lavée à l'acide (60/80mesh).
- Gaz vecteur : Azote.

matographie en phase gazeuse permet d'obtenir des fractions soumises à l'analyse par spectrophotométrie dans l'ultra-violet ou l'infra-rouge ou par spectrométrie de masse.

Magidman, Herb et leurs collaborateurs ont ainsi procédé pour identifier et doser les 64 acides gras trouvés dans le beurre [4, 5].

C'est également de cette façon que des produits formés au cours de l'oxydation des lipides du lait ont pu être séparés et identifiés (travaux de Forss [6, 7, 8, 9, 10], de El Negoumy [11], parmi beaucoup d'autres).

Mais, le plus souvent, la chromatographie en phase gazeuse est utilisée aussi comme méthode d'identification. On se base pour cette identification sur la mesure du volume de rétention, la comparaison avec des produits de référence, le comportement des composés sur deux colonnes de polarité différente. Les figures 1 et 2 constituent des exemples d'application. A partir du chromatogramme reproduit sur la figure 1, il est possible « d'identifier » plus d'une trentaine d'acides gras comprenant des acides saturés et monoènes à chaîne droite, et des acides iso et antéiso à chaîne ramifiée. De plus les acides diènes et triènes à 18 atomes de carbone sont également individualisés.

Les applications sont nombreuses dans le domaine de l'étude des lipides du lait.

Si l'on s'intéresse aux problèmes de qualité, le contrôle de la pureté du beurre par exemple peut être assuré par l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse soit des esters méthyliques préparés à partir des acides gras du beurre [12, entre autres], soit des acides gras eux-mêmes [13], soit de la fraction insaponifiable du beurre [14].

La chromatographie en phase gazeuse a été appliquée à de nombreux autres problèmes de recherches concernant la biochimie des lipides du lait. Quelques exemples tirés d'expériences personnelles, seront présentés.

Nous avons précisé les différences qui existent dans les proportions relatives des acides gras des laits de quelques espèces animales : ruminants et monogastriques [15]. Parmi les laits de ruminants, ceux de chèvre et de brebis contiennent toujours une proportion d'acide caprique nettement plus élevée que celle trouvée dans le lait de vache. D'autres différences spécifiques existent en ce qui concerne certains acides gras mineurs [16].

Le problème de l'influence de l'alimentation des vaches laitières sur la composition des acides gras du lait a donné lieu à un très grand nombre de publications. Les proportions relatives des acides gras du lait dépendent en effet dans une très large mesure des conditions d'alimentation des vaches laitières. De nombreux exemples peuvent être trouvés dans une publication récente [17].

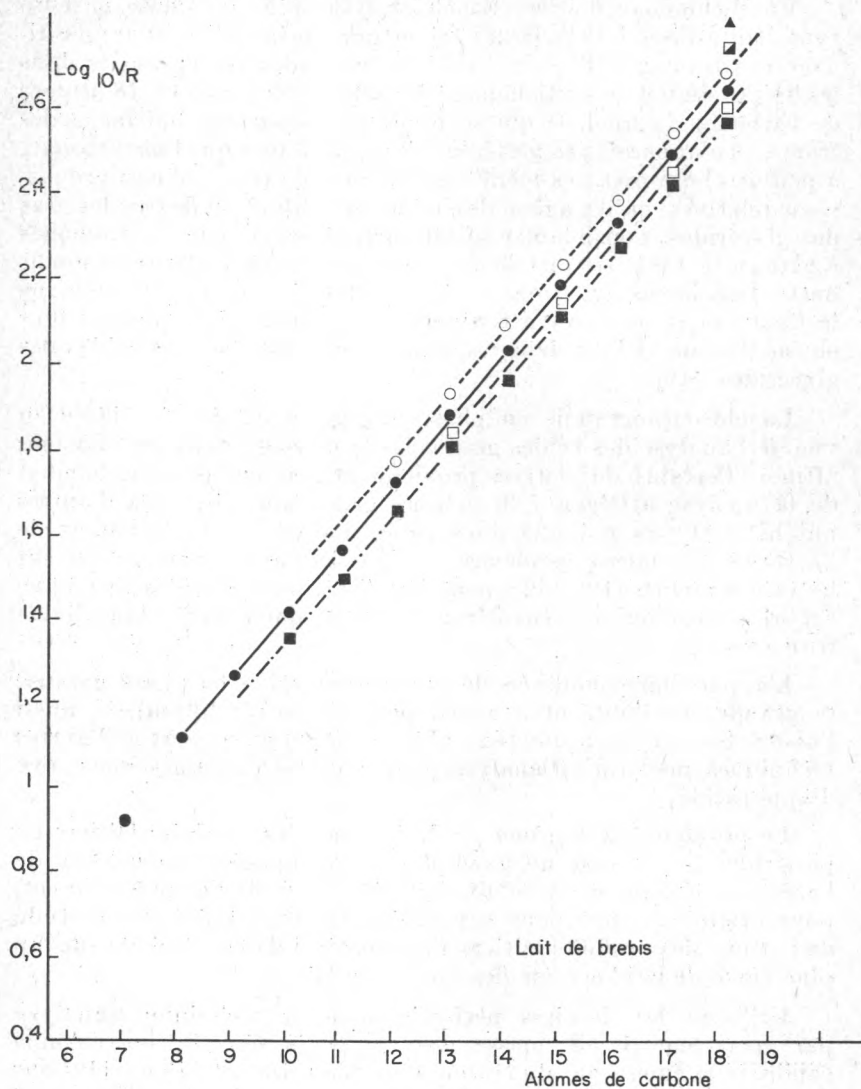


Fig. 2. — Relation entre le volume de rétention et le nombre d'atomes de carbone des acides gras.

(Le débit du gaz vecteur et la vitesse de déroulement du papier enregistreur étant constants, on calcule le logarithme de la distance entre le pic d'air et le pic correspondant à chacun des acides gras).

- — — — ● acides gras saturés à chaîne droite.
- - - - - - ○ acides gras monoènes à chaîne droite.
- — — — □ acides gras saturés à chaîne ramifiée (antéiso).
- - . - . ■ acides gras saturés à chaîne ramifiée (iso).

En technologie laitière, la chromatographie en phase gazeuse peut être utilisée à l'étude des acides gras libérés au cours de l'affinage des fromages. Si l'on considère les acides gras présents dans les lipides du lait (essentiellement les acides comptant 4 à 18 atomes de carbone), la lipolyse qui se produit au cours de l'affinage des fromages n'apparaît pas préférentielle, c'est-à-dire que l'on retrouve, à peu de chose près, les mêmes acides gras dans les mêmes proportions relatives, qu'il s'agisse des acides gras libres ou des acides gras des glycérides. Cependant ceci est surtout exact pour les fromages à pâte cuite. Cette similitude dans les proportions relatives est moins nette dans le cas des fromages à pâte molle et, en ce qui concerne le Camembert, on trouve toujours une proportion nettement plus élevée d'acide oléique dans les acides libres que dans les acides des glycérides [16].

La chromatographie en phase gazeuse a aussi été utilisée en vue de l'analyse des acides gras volatils présents dans les fromages affinés. Certains de ceux-ci proviennent, au moins partiellement de la lipolyse atteignant la matière grasse du lait, mais d'autres qui ne sont pas présents dans cette matière grasse résultent de l'activité des microorganismes, en particulier de leur action sur les acides aminés [18]. Telle peut être l'origine des acides formique, acétique, propionique, isovalérique et valérique trouvés dans divers fromages.

L'appareillage moderne de chromatographie en phase gazeuse (à grande sensibilité et à grand pouvoir de résolution), et aussi l'association de la chromatographie en phase gazeuse avec d'autres techniques modernes d'analyse, trouvent des domaines nouveaux d'application.

Le problème de l'arôme — de l'arôme des produits laitiers en particulier —, en est un exemple. Les composés responsables de l'arôme spécifique des produits laitiers ont en effet le plus souvent, pour origine et (ou) pour support la fraction lipidique. L'étude de l'arôme des produits laitiers s'inscrit ainsi dans l'étude beaucoup plus vaste de la biochimie des lipides du lait.

Utilisant les derniers perfectionnements techniques (analyse par spectrométrie de masse des composés séparés sur colonne capillaire et émergeant du chromatographe), Day et Libbey [19] ont décelé cent trente composés différents — dont la plupart ont été identifiés — lors de l'analyse de l'arôme du Cheddar.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des « vapeurs odorantes » des produits laitiers est une technique récente susceptible d'apporter des renseignements sur la qualité des produits laitiers, grâce à l'obtention de « profils » caractéristiques. Voici quelques applications qui concernent le lait [20, 21], la crème [22], et les fromages [23, 24]. Cette technique présente l'intérêt de se rapprocher de l'olfaction.

Des progrès considérables ont ainsi été obtenus dans la connaissance des composés responsables de l'arôme caractéristique des produits laitiers. La preuve en est fournie par le dépôt d'un certain nombre de brevets concernant soit des formules de « mélanges odorants » soit des procédés d'obtention de certains produits odorants. A titre d'exemple nous citerons un brevet donnant la formule d'un « mélange » à « l'arôme caractéristique de fromage bleu » [25].

Actuellement la chromatographie en phase gazeuse a cependant des limites. Le dosage des acides polyinsaturés du beurre par exemple, est nettement plus précis (sinon plus exact) par spectrométrie dans l'ultra-violet que par chromatographie en phase gazeuse. La spectrophotométrie dans l'ultra-violet permet en outre le dosage de l'acide diène conjugué, impossible par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions courantes, mais ne fournit par contre aucune indication concernant le poids moléculaire des acides gras. La chromatographie en phase gazeuse présente également des limites en ce qui concerne l'identification. Celle-ci n'est possible que lorsqu'il s'agit de séries homologues, et ne conduit jamais à une certitude absolue.

II. — La spectroscopie infra-rouge

La spectroscopie infra-rouge est par contre et par excellence une méthode d'identification.

A) *Considérations générales.*

La région du spectre électromagnétique correspondant au rayonnement infra-rouge s'étend de $0,8 \mu$ à $15, 25, 50$ ou même 100μ (infra-rouge lointain). Mais c'est essentiellement entre 2μ et 15μ que la technique d'analyse a été utilisée.

A chaque longueur d'onde du rayonnement correspond une fréquence de vibration. Or, dans la matière qui subit le rayonnement, des vibrations existent provenant du mouvement des atomes et des molécules. Ces vibrations de valence ou de déformation possèdent une fréquence déterminée. S'il y a identité entre la fréquence du rayonnement et la fréquence d'une vibration interne un phénomène d'absorption d'énergie prend naissance. Un signal est alors enregistré. Si on fait défiler l'ensemble des fréquences du rayonnement infra-rouge devant le composé, on obtient un spectre caractéristique de la molécule, une « empreinte digitale » permettant l'identification.

L'analyse par étude de l'absorption dans l'infra-rouge fournit avant tout des renseignements sur les groupes fonctionnels de la molécule. Pour un même groupe fonctionnel on a différentes bandes d'absorption correspondant à des vibrations de nature différente.

Prenons des exemples dans le domaine des lipides qui nous intéresse. On peut ainsi reconnaître les groupement OH , $-\text{CH}_2-$ et $-\text{CH}_3$ terminal. La double liaison est peu apparente sauf en

bout de chaîne (groupement vinyle). Par contre l'isométrie géométrique (liaison trans) au niveau de la double liaison donne une absorption forte. La bande est identique quel que soit l'emplacement de la double liaison (acide élaïdique ou acide vaccénique) et d'autant plus importante qu'il y a plus de liaisons trans (isolées), d'où l'utilisation de cette bande en analyse quantitative. Dans le cas des doubles liaisons conjuguées trans, on observe un déplacement du maximum : de 10,36 μ pour la liaison trans isolée on passe à 10,12 μ pour les liaisons conjuguées.

On distingue parfaitement la forme ester de la forme acide gras. En effet la vibration de valence du carbonyle de la fonction ester se manifeste à une fréquence plus élevée que celle du carbonyle de la fonction acide.

Les aldéhydes ont un spectre caractéristique : le OH de la fonction $-\text{C} \leq \begin{matrix} \text{H} \\ \text{O} \end{matrix}$ absorbe juste après les bandes CH_2 .

On peut distinguer dans des conditions de meilleure résolution c'est-à-dire en utilisant un prisme de fluorure de lithium par exemple (plus dispersif que le prisme ClNa entre 2 μ et 4 μ), les bandes correspondant au groupe OH des alcools ou au groupe OH des hydroperoxydes.

Ces quelques exemples n'ont pour but que de faire entrevoir les très grandes possibilités que possède cette méthode d'identification, dans le domaine de l'étude biochimique des lipides. L'application de la spectroscopie infra-rouge à l'étude des lipides a d'ailleurs fait l'objet de plusieurs publications [26, 27, 28, 29].

B) *Quelques exemples d'application à l'étude des lipides du lait.*

La spectroscopie infra-rouge, méthode d'identification s'applique essentiellement à l'analyse de composés déjà isolés par d'autres techniques (chromatographie en phase gazeuse ou en couche mince par exemple).

Ainsi à partir des lipides totaux du lait, il est possible d'identifier les fractions lipidiques isolées par chromatographie sur couche mince, ou par dialyse organique [30] : esters de stérol, triglycérides, acides gras libres, glycérides partiels et phospholipides.

Appliquée à l'analyse des acides gras, la spectroscopie infra-rouge permet le dosage quantitatif des liaisons trans. Le dosage de l'acide vaccénique (trans-11-octadécénoïque) dans le beurre a été effectué de cette façon [31]. Cependant la méthode de dosage basée sur l'absorption infra-rouge est relativement peu sensible. Le taux des isomères trans dans le beurre variant entre 3 et 8 p. 100 des acides gras totaux, il est préférable d'effectuer le dosage sur une fraction enrichie en isomères trans.

La spectroscopie infra-rouge trouve un champ d'application étendu dans l'identification des composés isolés lors de l'étude

de l'arôme des produits laitiers. Une simple modification de structure décelable par l'analyse infra-rouge (une isomérisation géométrique par exemple) peut en effet transformer la nature d'un arôme (27).

C) *Progrès récents concernant l'instrumentation infra-rouge.*

Tous les appareils destinés à l'analyse travaillent maintenant en double faisceau.

L'introduction des réseaux en remplacement des prismes a apporté une très grande amélioration. Non seulement ils permettent de se libérer des servitudes imposées par certains prismes, celui du chlorure de sodium notamment, mais ils améliorent nettement la qualité de l'analyse. Pour une même largeur de fente, la résolution est environ dix fois meilleure : par exemple l'intervalle de fréquence résolue sera de 1,1 cm^{-1} pour le prisme de chlorure de sodium alors qu'il sera de 0,12 cm^{-1} pour le réseau.

Ceci est important pour les recherches de structure pour lesquelles un spectre très détaillé est utile, et présente un intérêt particulier dans l'étude des liquides et des solides. L'utilisation des réseaux permet aussi de disposer d'une plus grande énergie (à largeur de fente égale) que dans le cas du prisme, et ceci permet une meilleure analyse des composés qui dispersent beaucoup. Le champ d'application des réseaux est donc plus grand que celui des prismes.

Un certain nombre d'accessoires utilisés dans l'analyse infra-rouge sont relativement récents. Ils permettent d'accroître les domaines d'utilisation de la méthode.

Certains accessoires permettent de travailler avec une plus faible quantité de produit. Ainsi, pour remplir une cuve de 0,1 mm d'épaisseur il faut disposer de dix gouttes environ de substance. Avec une microcuve, une goutte suffit.

Le pastillage très employé pour l'étude des solides, nécessite généralement 1 à 3 mg de substance broyée avec 300 mg de bromure de potassium, pour une pastille de 13 mm de diamètre. Il est maintenant possible de fabriquer des micropastilles avec 50 μg de substance et 25 mg de bromure de potassium. La pastille mesure 3 mm et est tenue par un anneau de plomb. On peut descendre à 15 μg de substance si on dispose d'un extenseur d'échelle. Enfin il est encore possible avec seulement 1,5 μg de substance de fabriquer une ultra-micropastille de 0,5 mm. Il est alors nécessaire de l'« illuminer » davantage. Ceci est possible avec le microilluminateur [32].

Parmi les autres accessoires susceptibles de nous intéresser, citons la cuve chauffante qui permet d'accroître les possibilités d'absorption par dissociation thermique des molécules associées, le polariseur dont l'utilisation permet de connaître l'orientation des chaînes moléculaires ou des cristaux.

Des accessoires de réflexion existent permettant l'étude du spectre de réflexion de surfaces plates et les spectres d'absorption de revêtements transparents sur des surfaces réfléchissantes.

L'accessoire ATR [33], de réflexion totale atténuée, peut trouver dans le laboratoire de recherches laitières quelque application nouvelle grâce à la diversité de nature des échantillons qui peuvent ainsi se prêter à l'analyse infra-rouge (morceaux de fromage, par exemple).

Le spectre obtenu est différent d'un spectre d'absorption, et généralement moins résolu, mais on y trouve cependant les bandes fondamentales. Cet accessoire est encore trop récent pour qu'une juste appréciation puisse être portée sur lui, surtout dans le domaine qui nous occupe.

L'analyse par spectroscopie infra-rouge, comme la chromatographie en phase gazeuse, a aussi ses limites.

La spectrométrie de masse peut alors compléter la spectroscopie infra-rouge, en particulier pour la détermination du poids moléculaire. Le spectre de masse indique à côté du poids moléculaire du composé principal, les poids moléculaires des fragments de la molécule. Ces fragments sont caractéristiques d'un composé. Il n'est cependant pas possible, par spectrométrie de masse, de distinguer les isomères (isomères stériques, par exemple).

Conclusion

Un mot pourrait être dit en ce qui concerne le prix de revient des analyses. Kienitz [34] a présenté un tableau concernant cette question où l'on peut voir que la microanalyse organique coûte, par exemple, dans des conditions données, 11 000 D.M. (13 750 F) par an avec un coût par analyse de 11 D.M. (13,7 F). Le rapport coût en équipement/coût en personnel est de 8 : 100.

Dans les mêmes conditions l'analyse infra-rouge coûte 22 000 D.M. (27 400 F) avec un coût par analyse de 5 D.M. (6,25 F). Ce qui revient à dire que, pour le même prix, on effectue deux fois plus d'analyses par infra-rouge que par microanalyse organique, mais le rapport coût en équipement/coût en personnel devient 83 : 100.

Dans le domaine de la biochimie des lipides du lait, l'utilisation des techniques modernes d'analyse est indispensable si l'on désire accroître les connaissances fondamentales concernant la composition de ces lipides, les mécanismes de biosynthèse qui les concernent et les processus de transformation et d'altération, à l'origine de tant de problèmes pratiques. Le choix des sujets de recherche peut être guidé par l'équipement dont on dispose. Ceci permet d'utiliser davantage les appareils et de les amortir plus rapidement.

Cet équipement analytique moderne se prête bien aux exigences des laboratoires de contrôle. Des analyses en série peuvent être facilement exécutées.

On peut rappeler ici l'utilisation de la spectroscopie infra-rouge pour le dosage simultané de la matière grasse, de la matière azotée, du lactose et de l'extrait sec dégraissé d'un échantillon de lait [35]. Cependant ce dosage n'est possible qu'en utilisant le spectromètre infra-rouge spécialement conçu pour atteindre cet objectif [36].

Il est souhaitable, dans un laboratoire moderne s'intéressant à la biochimie des lipides du lait, de disposer d'un équipement d'ensemble, comportant plusieurs chromatographes et plusieurs spectrophotomètres (ultra-violet, visible, infra-rouge) s'ajoutant à l'équipement devenu classique de chromatographie sur colonne et sur couche mince. Les meilleurs résultats analytiques sont fournis par l'emploi conjugué des différentes méthodes. Un regroupement de divers services de recherches ou de contrôle, ayant pour objectif l'étude des lipides du lait ou des produits animaux par exemple, peut ainsi s'avérer nécessaire, un même service analytique étant mis à la disposition des autres services.

Summary

New analysis techniques can now be employed for investigating the biochemistry of milk lipids.

Gas chromatography enables not only the separation of compounds but also, in some cases, their identification and their amount. Infra-red spectroscopy is particularly suitable for identification of compounds, and new improvements are described.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. P. W. SCOTT. — *Laboratory Practice* (Série I, Analyt.), 1961, 607.
- [2] E. H. RAMSHAW et STARK W. — *Austr. J. Dairy Techn.*, 1961, 16, 243.
- [3] C. SCHOEDLER. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1962, 2323.
- [4] P. MAGIDMAN, S. F. HERB, R. A. BARFORD et RIEMENSCHNEIDER R. W. — *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, 39, 137.
- [5] S. F. HERB, P. MAGIDMAN, F. E. LUDDY et R. W. RIEMENSCHNEIDER. — *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, 39, 142.
- [6] E. G. PONT, D. A. FORSS, E. A. DUNSTONE et L. F. GUNNIS. — *J. Dairy Res.*, 1960, 27, 205.
- [7] D. A. FORSS, E. A. DUNSTONE et W. STARK. — *J. Dairy Res.*, 1960, 27, 211.
- [8] D. A. FORSS, E. A. DUNSTONE et W. STARK. — *J. Dairy Res.*, 1960, 27, 373.
- [9] D. A. FORSS, E. A. DUNSTONE et W. STARK. — *J. Dairy Res.*, 1960, 27, 381.
- [10] W. STARK et D. A. FORSS. — *J. Dairy Res.*, 1962, 29, 173.
- [11] A. M. EL NEGOUY, M. S. DE FUCHAL et E. G. HAMMOND. — *J. Dairy Sci.*, 1962, 45, 311.
- [12] F. FRANCESCO et AVANCINI D. — *Il Latte*, 1961, 35, 809.

- [13] J. B. ROOS, A. VERSNEL et G. A. WERDMULLE. — *Kieler Milchwirts. Fors.*, 1963, 15, 515.
- [14] J. EISNER, N. P. WONG, D. FIRESTONE et J. BOND. — *J. Ass. Off. Agric. Chem. Wash.*, 1962, 45, 337.
- [15] S. KUZZDAL-SAVOIE et W. KUZZDAL. — *Le Lait*, 1963, 43, 369.
- [16] S. KUZZDAL-SAVOIE. — (Travaux non publiés).
- [17] S. KUZZDAL-SAVOIE. — *Thèse*, Faculté des Sciences de Paris, 1964. Série A, n° 4277-5128.
- [18] W. RITTER et HANNI H. — *Milchwissenschaft*, 1960, 15, 296.
- [20] E. A. DAY et L. M. LIBBEY. — *J. Food Sci.*, 1964, 29, 583.
- [20] W. G. JENNINGS, S. VIJHALMSSON et W. L. DUNKLEY. — *J. Food Sci.*, 1962, 27, 306.
- [21] R. BASSETTE, S. OZERIS et C. H. WHITNAH. — *J. Food Sci.*, 1963, 28, 84.
- [22] N. P. WONG. — *J. Dairy Sci.*, 1963, 46, 571.
- [23] W. W. NAWAR et I. S. FAGERSON. — *Food Techn.*, 1962, 107.
- [24] M. KROGER et S. PATTON. — *J. Dairy Sci.*, 1964, 47, 296.
- [25] V. S. BASIVOTTO. — (Chas. Pfizer et Co., Inc., U.S. 3, 034, 902) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1962, 39, 28 (Abstr.).
- [26] H. P. KAUFMANN, F. VOLBERT et G. MANKEL. — *Fette Seifen Anstrich.*, 1959, 61, 547 et 643.
- [27] J. F. HORWOOD. — *Aust. J. Dairy Techn.*, 1962, 17, 90.
- [28] J. CHOUTEAU. — *Revue Française des Corps gras*, 1961, 267.
- [29] R. T. O'CONNOR. — *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1956, 33, 1.
- [30] G. J. BEERSVON, H. DE IONGH et J. BOLDINGH. — Dans « Essential Fatty Acids », Sainclair N. M. Ed. Londres, *Butterworth Scientific publications*, p. 43.
- [31] R. H. BACKDERF et J. B. BROWN. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, 76, 15.
- [32] *Notice Technique de la Société Perkin Elmer.*
- [33] *Instrument new*, 1962, 14, p. 1, 6 et 7.
- [34] H. KIENITZ. — *Chemie-Ingenieur. Technik*, 1960, 32, 641 (documentation communiquée par la Sté Perkin Elmer)
- [35] J. D. S. GOULDEN. — *Nature*, Lond., 1961, 191, 905.
- [36] J. D. S. GOULDEN, J. SHIELDS et R. HASWELL. — *J. Soc. Dairy Techn.*, 1964, 17, 28.