



Revue des méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides, principalement des lipides des produits laitiers

M. Collomb et Monika Spahni

Composés contribuant à des saveurs d'oxydation typiques des produits laitiers selon Badings et Neeter (17)

Composés	Flaveurs		
Alcanals C6-C11	green - tallowy	d'herbe - suiffeuse	nach Gras - talgig
2-alcénals C6-C10	green - fatty	d'herbe - graisseuse	nach Gras - fettig
2,4-alcadiénals C7-C10	oily - deep-fried	d'huile frite	ölig - übererhitzt
3-cis-hexénal	green	d'herbe	nach Gras
4-cis-hepténal	creamy / putty	crémeuse / de mastic	rahmig / nach Kitt
2,6- et 3,6-nonadiénal	cucumber	de concombre	nach Gurke
2,4,7-décatriénal	fishy, sliced beans	de poisson, de haricots verts	fischig, nach grünen Bohnen
1-octène-3-one	metallic	métallique	metallisch
1,5-cis-octadiène-3-one	metallic	métallique	metallisch
1-octène-3-ol	mushroom	de champignon	nach Pilz

Revue des méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides, principalement des lipides des produits laitiers

M. COLLOMB et MONIKA SPAHNI
Station fédérale de recherches laitières
3097 Liebefeld-Berne

Reçu le 2 février 1996

Ce travail décrit brièvement les mécanismes d'autooxydation des lipides et présente les principaux produits d'oxydation (aldéhydes, cétones, alcools, alcanes) qui peuvent être trouvés dans les lipides des produits laitiers. Il passe en revue les principales méthodes de dosages des produits primaires et secondaires de l'oxydation des lipides ainsi que les tests de mesure de la stabilité à l'oxydation.

Introduction

L'oxydation des lipides est un processus chimique complexe qui a fait l'objet de nombreux ouvrages et revues (1-32). Les réactions de l'oxygène sur les parties insaturées des acides gras forment d'abord des produits d'oxydation primaires appelés hydroperoxydes. Ces hydroperoxydes se décomposent en produits d'oxydation secondaires (aldéhydes, cétones, alcools, alcanes etc.) responsables de saveurs indésirables. Ces saveurs d'oxydation sont communément appelées saveurs de carton, de peinture, métalliques, huileuses, de suif, de poisson (16). Les laits provenant de vaches individuelles peuvent développer ces saveurs si rapidement qu'on parle d'une oxydation spontanée (4, 16). Selon la *Fédération Internationale de Laiterie* (FIL) (4), ce problème peut devenir endémique dans une région, persister pendant quelques années puis régresser sans raisons apparentes. Une cause majeure des saveurs d'oxydation du lait est la présence de catalyseurs métalliques. Cette cause est si importante qu'elle a conduit Bodlyfelt et al. (32) à classer les laits selon leur susceptibilité à l'oxydation. Ces auteurs font une distinction entre les laits qui s'oxydent spontanément sans la présence de cuivre et de fer, ceux qui ne s'oxydent pas spontanément mais développent des saveurs d'oxydation qu'en présence de ces métaux et ceux qui ne développent pas de saveurs d'oxydation. Divers autres facteurs peuvent influencer la stabilité à l'oxydation du lait. L'acide ascorbique a un rôle prooxydant aux concentrations dans lesquelles il se trouve dans le lait (10-20 mg / L). A des concentrations élevées, il a une action antioxydante (4, 31). L'affouragement peut mo-

difier les concentrations en antioxydants liposolubles tels que les tocophérols (31, 33) et les carotènes (31, 34). L'homogénéisation augmente la durée de la stabilité à l'oxydation probablement en raison d'une meilleure protection des glycérides assurée par les nouvelles membranes constituées essentiellement de caséine (4). Il en est de même pour les chauffages (pasteurisations, upérisations) en raison des groupes sulfhydryles antioxydants libérés durant ce processus (16, 31). Parmi les autres produits laitiers, le beurre, l'huile de beurre et la crème peuvent facilement développer des saveurs d'oxydation en raison de leur teneur élevée en matière grasse (MG). Dans le beurre, des études intensives ont été effectuées sur l'origine de la saveur de poisson (35, 48) et sur l'efficacité des emballages pour prévenir la photooxydation (24, 31, 36). En pratique, on améliore fortement la qualité et la conservabilité du beurre en transformant des crèmes contenant peu de métaux lourds et en les pasteurisant à haute température afin de libérer des groupes sulfhydryles antioxydants (31, 37, 38). D'une manière générale, l'oxydation des lipides est considérée comme un processus essentiellement destructif car il conduit à une détérioration des membranes protectrices des globules gras par oxydation des phospholipides, à la diminution de la valeur nutritive des aliments (p.ex. par la réduction des teneurs en acides gras insaturés, en diverses vitamines) et à la production de saveurs indésirables.

De nombreuses méthodes ont été développées pour le dosage des produits d'oxydation primaires et secondaires des lipides ainsi que pour la détermination de la stabilité à l'oxydation des produits laitiers (2, 3, 5, 39, 40). Le but du présent travail consiste à passer en revue les principales méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides des denrées alimentaires et spécialement des produits laitiers.

Mécanismes des réactions d'oxydation des lipides

Il s'agit de réactions en chaîne autocatalysées qui se déroulent sur les parties insaturées des lipides. Ce processus

peut se dérouler par des mécanismes de réaction d'autooxydation ou par voie enzymatique. Les réactions d'oxydation par voie enzymatique sont très répandues dans les huiles végétales et les graisses de dépôt (5, 31). Ces enzymes, appelés lipoxygénases, réagissent de manière stéréospécifique de préférence sur les acides gras libres insaturés plutôt que sur les glycérides (26).

Mécanismes d'autooxydation (26)

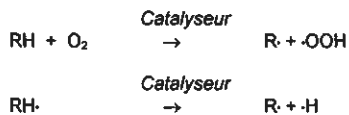
On distingue le mécanisme de réaction classique des radicaux libres qui se déroule même à l'ombre en trois étapes bien connues (initiation, propagation et terminaison) et celui de la photooxydation. Les figures 1 et 2 présentent les mécanismes des réactions chimiques par la voie classique des radicaux libres et par voie photochimique.

Les mécanismes de réactions chimiques par la voie classique des radicaux libres font appel à des radicaux lipidiques R• formés par interaction avec l'oxygène en présence de catalyseurs tels que les métaux, la lumière, des radiations de haute énergie etc.. Le radical formé dans l'étape d'initiation peut réagir pour former un radical peroxy dans l'étape de propagation qui peut lui-même former un hydroperoxyde. L'étape de propagation peut se poursuivre de manière autonome ou se terminer par les mécanismes de

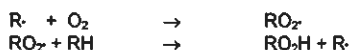
terminaison. L'oxydation des acides gras mono- ou polyinsaturés conduit à de nombreux hydroperoxydes dus aux dif-

Figure 1 Mécanisme d'oxydation des lipides par la voie classique des radicaux libres

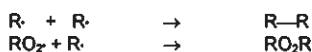
Etape d'initiation:



Etape de propagation:



Etape de terminaison

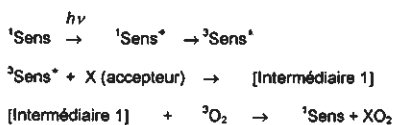


Abréviations:

RH: Lipide insaturé
R·: Radical d'un lipide
RO₂·: Radical d'un peroxy lipide

Figure 2 Mécanisme d'oxydation des lipides par voie photochimique selon Hamilton (26)

Type I



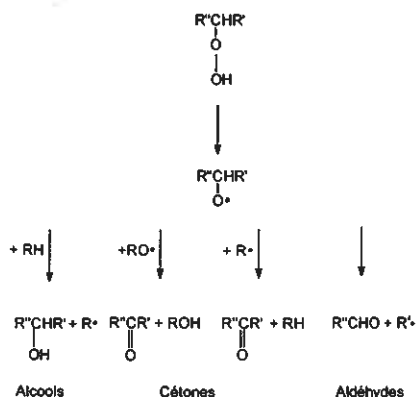
Type II



Abréviations:

¹Sens: Photosensibilisateur à l'état fondamental
¹Sens*: Photosensibilisateur excité à l'état singulet
³Sens*: Photosensibilisateur excité à l'état triplet
¹O₂*: Oxygène excité à l'état singulet
³O₂: Oxygène à l'état triplet
XO₂: Peroxyde
RH: Lipide
ROOH: Hydroperoxyde

Figure 3 Mécanismes de dégradation des hydroperoxydes en aldéhydes, alcools et cétones selon Hamilton (26)



Abréviations:

R¹R²CHOOH: Hydroperoxy lipide
R¹R²CHO·: Radical alcoxy lipide
RO·: Radical alcoyle
R·: Radical alkyle
OH: Radical hydroxyle

férents radicaux allyliques mésomères et aux diverses configurations cis-trans possibles.

La photooxydation se déroule en présence de lumière et de photosensibilisateurs (Sens) tels que la riboflavine, les métaux lourds etc.. On connaît deux types de photooxydations. Le photosensibilisateur à l'état fondamental (¹Sens) absorbe de l'énergie provenant de radiations des domaines visible ou ultraviolet et est converti en un état excité singulet (¹Sens*) puis passe par un état triplet (³Sens*) en retournant à l'état fondamental (émission de fluorescence). Selon le mécanisme du type I, le photosensibilisateur à l'état triplet peut réagir avec un substrat X (accepteur) pour former un radical ou un ion radical (Intermédiaire 1) qui réagit avec de l'oxygène à l'état triplet pour former des produits d'oxydation (XO₂). Selon le mécanisme du type II, le sensibilisateur à l'état triplet réagit avec l'oxygène triplet pour former un oxygène singulet qui réagit avec les lipides (RH) pour former des hydroperoxydes (ROOH). Certaines molécules peuvent prévenir les réactions du type II en réagissant plus vite avec l'oxygène singulet que les lipides. Avec l'acide linoléique, on sait que l'oxygène singulet réagit 1500 fois plus vite que l'oxygène triplet et directement sur les double liaisons en les déplaçant (réactions ène) pour former des hydroperoxydes allyliques.

Les nombreux hydroperoxydes formés selon les mécanismes réactionnels précités sont des produits sans saveurs, métastables qui sont décomposés en radicaux alcoyls puis en produits secondaires de l'oxydation des lipides tels que des composés carbonylés, des hydrocarbures, des cétones etc. responsables, eux, de la détérioration des saveurs des produits laitiers. La figure 3 présente les mécanismes simplifiés de la formation des produits d'oxydation secondaires (aldéhydes, alcools et cétones) à partir des produits d'oxydation primaires (hydroperoxydes).

Période d'induction

Les réactions d'oxydation dans les aliments passent en général par une première phase appelée phase d'induction durant laquelle les vitesses des réactions d'oxydation se déroulent à une vitesse uniforme et lente puis par une deuxième phase durant laquelle ces vitesses s'accroissent fortement. Le point d'inflexion entre les deux phases constitue une mesure de la qualité d'un aliment (41). Différents facteurs, tels que la présence d'antioxydants naturels ou ajoutés ou certains processus technologiques comme le chauffage ou l'homogénéisation permettent d'augmenter la durée de la période d'induction.

Provenance des produits d'oxydation secondaires des lipides des produits laitiers

Dans le lait, les phospholipides des membranes des globules gras sont généralement considérés comme les précurseurs de l'autooxydation (30, 31). Les acides gras insaturés des glycérides sont oxydés par la suite. Les produits formés lors de l'oxydation sont dépendant de la composition en acides gras insaturés des lipides (43). Les lipides du lait contiennent environ 28 - 48 % d'acides gras insaturés dont plus de 95 % sont représentés par les acides oléique (21.1 - 30.5 %), linoléique (2.1 - 7.7 %) et linoléique (environ 1.3 - 3.4 %) (53). Le nombre, la position et la configuration des double liaisons de ces acides gras insaturés influencent les vitesses d'autooxydation (26, 31). Les vitesses d'oxydation relatives pour les acides arachidonique, linoléique, linoléique et oléique se situent dans un rapport approximatif de 40:20:10:1 (31). Les double liaisons conjuguées sont plus réactives que les non-conjuguées et celles en configuration cis sont plus réactives que celles en configuration trans (31). Le tableau 1 présente les principaux produits d'oxydation secondaires des lipides du lait et leurs précurseurs selon divers auteurs.

On constate que les produits carbonylés sont les plus représentatifs de l'oxydation et qu'ils appartiennent à quatre classes de composés, les n-alcanals, les 2-alcénals, les 2,4-alcadiénals et les 2-alcanones (31). Badings (48) a analysé les produits obtenus par autooxydation des acides oléique, linoléique, linoléique et arachidonique purs. Après analyse d'un beurre ayant une saveur de poisson, cet auteur note la bonne concordance entre les produits formés par autooxydation des acides purs et du beurre. Selon Forss (46), les aldéhydes à chaîne linéaire constituent les produits d'oxydation les plus importants alors que ceux à chaîne ramifiée sont formés par dégradation des acides aminés.

Quant aux composés 2-cétoniques, ils peuvent provenir de la décarboxylation des acides β-cétoniques. Stark et Forss (44) ont rapporté que le octa-1-ène-3-one est responsable de la saveur métallique. Selon Swoboda et Peers (45), cette saveur est typiquement due à la présence de vinyl cétones. Ces derniers auteurs ont identifié dans l'huile de beurre une autre vinyl cétone avec une limite de détection sensorielle de la saveur métallique encore plus basse, le octa-1-cis-5-diène-3-one. Selon Maga (22), les furanes proviennent essentiellement des

réactions de brunissement des aliments (22). Cependant, Chang et al. (47) ont démontré qu'au moins un furanne, le 2-n-pentylfuranne peut se former par oxydation de l'acide linoléique. Quant aux alcanes, l'éthane provient de la dégradation oxydative de l'acide linoléique (49) et le pentane de celle de l'acide linoléique (50). De nombreuses autres saveurs peuvent se former lors de processus technologiques comme par exemple des lactones qui sont produites lors du chauffage de la MG laitière (56).

Méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides

Pour doser des produits d'oxydation des lipides, on a à disposition de nombreuses méthodes, signalées et critiquées dans des ouvrages (2, 3, 5, 28, 29) et des revues de littérature (39, 40). On peut doser le substrat (oxygène), les produits d'oxydation primaires (radicaux, hydroperoxydes, etc.) et secondaires (aldéhy-

des, cétones etc.) des lipides oxydés. Ces méthodes sont utilisées pour déterminer l'état d'oxydation des lipides et pour estimer leurs stabilités à l'oxydation. Les tests de stabilité à l'oxydation sont également traités dans ce document.

Dosage des substrats

Les lipides et l'oxygène constituent les deux substrats nécessaires à l'oxydation.

Tableau 1 Provenance des principaux produits d'oxydation secondaires des lipides du lait selon divers auteurs

Précurseurs	Produits d'oxydation secondaires	Références
Acide oléique	<i>Alcanals</i> : heptanal, octanal ¹⁾ , nonanal ¹⁾ , décanal <i>Alcénales</i> : 2-t-décénal ¹⁾ , 2-t-undécénal ¹⁾	Badings (48)
Acide linoléique	<i>Alcanals</i> : pentanal ¹⁾ , hexanal ¹⁾ , heptanal, octanal <i>Alcénales</i> : 2-t-hepténal ¹⁾ , 2-t-octénal ¹⁾ , 2-c-octénal ¹⁾ , 2-t-nonénal ¹⁾ , 2-c-décénal ¹⁾ , 3-t-nonénal ¹⁾ , 3-c-nonénal ¹⁾ <i>Alcadiénals</i> : 2-t, 4-t-nonadiénal, 2-t, 4-t-décadiénal ¹⁾ , 2-t, 4-c-décadiénal ¹⁾ <i>Autres composés</i> : vinyl amyl cétone ¹⁾ , vinyl amyl carbinol ¹⁾	Badings (48)
Acide linoléique	<i>Alcanals</i> : éthanal ¹⁾ , propanal ¹⁾ , hexanal <i>Alcénales</i> : 2-t-buténal ¹⁾ , 2-t-penténal ¹⁾ , 2-c-penténal ¹⁾ , 2-t-hexénal ¹⁾ , 2-t-hepténal ¹⁾ , 3-t-hexénal ¹⁾ , 3-c-hexénal ¹⁾ <i>Alcadiénals</i> : 2-t, 4-t-heptadiénal ¹⁾ , 2-t, 4-c-heptadiénal ¹⁾ , 2-t, 5-c-octadiénal ¹⁾ , x-c, y-c-nonadiénal ¹⁾ , 2-t, 6-c-nonadiénal ¹⁾ <i>Alcatriénals</i> : 2,4,7-décatriénal (2 isomères cis-trans) <i>Autres composés</i> : vinyl éthyl cétone, 3,5-octadiène-2-one	Badings (48)
Acide arachidonique	<i>Alcanals</i> : pentanal ¹⁾ , hexanal ¹⁾ <i>Alcénales</i> : 2-t-hepténal ¹⁾ , 2-t-octénal ¹⁾ , 2-c-octénal ¹⁾ , 3-c-nonénal ¹⁾ , 4-c-décénal <i>Alcadiénals</i> : 2-t, 4-t-décadiénal ¹⁾ , 2-t, 4-c-décadiénal ¹⁾ <i>Alcatriénals</i> : deux 2,4,x-tridécatriénals ¹⁾ (x>6, possible cis-trans isomères) <i>Autres composés</i> : 3-octène-2-one ¹⁾ , vinyl éthyl cétone ¹⁾ , 3,5-undécadiène-2-one ¹⁾ , vinyl amyl carbinol	Badings (48)
Beurre avec flaveur de poisson	<i>Alcanals</i> : 3-méthylbutanal ²⁾ , pentanal, hexanal ²⁾ , heptanal ²⁾ , octanal ²⁾ , nonanal ²⁾ , décanal, undécanal, dodécanal <i>Alcénales</i> : 2-t-penténal, 2-t-hexénal, 2-t-hepténal, 2-t-octénal, 2-t-nonénal ²⁾ , 2-t-décénal, 2-t-undécénal, 4-t-hepténal, 4-c-hepténal <i>Alcadiénals</i> : 2-t, 4-t-heptadiénal, 2-t, 4-c-heptadiénal, 2-t, 4-t-nonadiénal, 2-t, 6-t-nonadiénal, 2-t, 6-c-nonadiénal, 2-t, 4-t-décadiénal, 2-t, 4-c-décadiénal, 2-t, 4-t-undécadiénal, 2,x-octadiénal (x>4) <i>Alcatriénals</i> : 2-t, 4-t, 6-t-nonatriénal + un isomère cis-trans, deux isomères cis-trans du 2,4,7-décatriénal <i>Alcanones</i> : 2-heptanone ²⁾ , 2-nonanone ²⁾ , 2-undécanone ²⁾ <i>Cétones insaturées</i> : vinyl éthyl cétone ²⁾ , vinyl amyl cétone, 3,5-octadiène-2-one (2 isomères cis-trans), 3,5-undécadiène-2-one <i>Autres composés</i> : benzaldéhyde, vinyl amyl carbinol	Badings (48)

Suite du tableau 1

Acide linoléique	<i>Composés en concentrations > 100 µg/g</i> : Pentane ³⁾ , hexanal, 2-t-hepténal, 2-c-octénal, 2-t-octénal, 2-t-4-c-décadiénal, 2-t-4-t-décadiénal	Prior et Löliger (29)
Acide linoléique	2-n-pentylfuranne	Chang et al. (47)
Acide polyénique (n-3)	Octa-1-ène-3-one	Stark et Forss (44)
Acide polyénique (n-6)	Octa-1-cis-5-diène-3-one	Swoboda et Peers (45)
Acide linoléique	Ethane	Grosch (49), Löliger (50), Pitkänen et al. (51)
Acide linoléique	Pentane	Farr et al. (54), Burri et al. (55), Löliger (50), Pitkänen et al. (51)

¹⁾ Composés théoriquement possible

²⁾ Composés présents mais en faibles quantités

³⁾ Composé non quantifié mais facilement mesurable

La diminution des teneurs en acides gras insaturés liés au glycérol ou l'augmentation de celles des acides gras libres mono- ou dicarboxyliques à nombre de carbones pairs ou impairs formés lors de l'autooxydation (62) pourraient constituer des critères de l'état d'oxydation des lipides. Cependant, les flaveurs d'oxydation sont détectées à des concentrations très basses ($< 0,00002\%$) (29) et les précisions des méthodes d'analyse de la composition en acides gras des lipides et des acides gras libres sont malheureusement insuffisantes (respectivement 0,1-0,5 % (29) et 5-10 % (57) pour prouver de manière significative de si faibles différences de concentrations. Quant au dosage de l'oxygène, il peut être effectué par chromatographie gaz-solide (colonne de tamis moléculaire) à l'aide d'un détecteur à conductibilité thermique (58). Le plus souvent, toutefois, on mesure le paramagnétisme particulièrement élevé de cet élément, ou l'oxygène diffusant à travers une membrane par polarographie, ou le potentiel de Nernst que génère une électrode à électrolyte solide (58). Löliger (50) utilise un détecteur paramagnétique qui sert simultanément à l'échantillonnage pour d'autres constituants de l'espace de tête. L'oxygène dissous dans le lait peut donner des indications sur l'autooxydation du lait durant les premiers temps après la traite ou après les processus de traitements technologiques (59-61).

Dosage des produits d'oxydation primaires

Pour la détermination des produits d'oxydation primaires, on fait surtout appel aux déterminations des radicaux libres par résonance paramagnétique électronique (RPE), des peroxydes par iodométrie (indice de peroxyde), à des dosages par spectrophotométrie (indice de peroxyde, dosage des diènes conjugués, mesures de la fluorescence et de la chimiluminescence) et par chromatographie (HPLC, GC, GC-MS).

Dosage des radicaux par résonance paramagnétique électronique (RPE)

La technique RPE permet de mesurer les radicaux de faible durée de vie formés durant l'oxydation lipidique. On peut ainsi élucider les structures chimiques des radicaux dans le but de comprendre les mécanismes des réactions d'oxydation et d'antioxydation. Cette technique est habituellement utilisée pour suivre la détérioration oxydative et déterminer la stabilité à l'oxydation des lipides. Prior et Löliger (29) ont corrélié la progression du

signal RPE mesuré semi-quantitativement durant l'entreposage de farine d'avoine (non traitée, chauffée sous pression et rôtie) en relation avec les teneurs en pentane mesurés dans l'espace de tête des emballages. L'intensité du signal RPE de la farine rôtie augmente fortement après une certaine durée d'entreposage et plus ou moins parallèlement à la concentration en pentane. Pour l'étude des antioxydants, on les ajoute habituellement en concentrations relativement élevées (63, 64, 65) et on mesure les radicaux des antioxydants formés après réaction avec les alkylperoxy. Bascetta et al. (64) ont employé cette technique pour l'étude du rôle des vitamines E et C dans le processus d'oxydation dans une membrane modèle. Le signal RPE du radical tocophéroxyl disparaît complètement en présence de vitamine C. Lambelet et Löliger (65) ont mesuré la stabilité à l'oxydation de graisses de poulets additionnées de α -, β -, γ - et δ -tocophérols. Les radicaux α -tocophéroxyls sont formés en concentrations relativement élevées mais ont une durée de vie plus courte que les autres isomères qui sont formés en concentrations plus faibles. Le pouvoir antioxydant des tocophérols se situe dans le rapport relatif $\alpha < \beta \approx \gamma < \delta$. Récemment, Prior et Lambelet (66, communication personnelle) ont suivi durant plus d'une année l'évolution de l'oxydation sous conditions accélérées (réduction de l'activité de l'eau, augmentation de la teneur en oxygène dans l'espace de tête, exposition au rayonnement UV) dans des poudres de lait enrichies en MG conservés dans des emballages en fer blanc ou en verre. L'oxydation a été suivie par analyse de l'oxygène résiduel, des alcanes (éthane et pentane) et des radicaux. Selon ces auteurs, la radiation UV accélère le plus fortement l'oxydation (Période d'étude: 2-3 mois) mais n'est cependant pas applicable à la détermination de la stabilité à l'oxydation en raison d'un mécanisme réactionnel différent. Dans tous les cas, l'analyse des radicaux a permis une détermination plus précoce de l'oxydation que celle des constituants de l'espace de tête.

Détermination

de l'indice de peroxyde (IP)

L'IP est la méthode la plus fréquemment employée pour le dosage des produits d'oxydation primaires contenus dans les huiles et les graisses. Dans les produits laitiers, les dosages sont généralement effectués sur la graisse anhydre extraite (68, 69) mais rarement directement sur les produits bruts (70, 84). Les solvants d'extraction doivent être exempts de peroxydes, l'extraction doit être effectuée sous lumière réduite (l'extraction à la lumière naturelle peut doubler les valeurs

de l'IP (68)) et on utilise parfois des mélanges désémulsifiants (67, 68, 69) pour obtenir un meilleur taux d'extraction des lipides dans des produits tels que les laits, poudres de lait, crèmes, etc. Il faut savoir que les diverses méthodes répertoriées sont hautement empiriques et toute modification de la procédure peut donner des résultats analytiques différents. Pour obtenir des valeurs répétables, des facteurs tels que la pesée de MG, les concentrations en réactifs ainsi que la température et les temps de réaction doivent être optimisés. Dès lors, la méthode appliquée doit toujours être indiquée. Les résultats d'analyse sont habituellement exprimés en milliéquivalents d'oxygène ou de peroxyde par kg de MG. On distingue trois groupes de méthodes basées sur l'oxydation par les peroxydes du iodure, du fer II ou du 1,5-diphénylhydrazide. Le tableau 2 présente les principales méthodes de dosage de l'IP.

Pour le dosage des peroxydes par iodométrie, la MG est le plus souvent dissoute dans un mélange d'acide acétique glacial et de chloroforme auquel on a additionné du iodure de potassium. Le iode libéré par les peroxydes des lipides est titré par du thiosulfate de sodium. La consommation du iodure par les doubles liaisons et le iode libéré par l'oxygène dissous constituent les deux principales sources d'erreur de cette méthode. La méthode proposée en 1931 par Lea (72) est à la base du mode opératoire iodométrique. Cet auteur propose de chauffer les lipides dans un mélange de chloroforme et d'acide acétique glacial 1 + 2 (V/V) en présence de iodure de potassium solide. L'oxydation du iodure et des lipides par l'oxygène de l'air avant le chauffage est prévenue par rinçage préalable du tube d'essai avec de l'azote et celle durant le chauffage par la pression de vapeur des solvants dans l'espace de tête. Après refroidissement, le mélange est versé dans une solution aqueuse de iodure de potassium et titré. Selon Wheeler (73), le iodure solide reste non dissous et ce mode opératoire demande donc des agitations et chauffages répétés. Cet auteur propose d'employer un mélange de chloroforme et d'acide acétique glacial 2 + 3 (V/V) qui permet une dissolution homogène des lipides et du iodure de potassium. L'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (74) et l'American Oil Chemists' Society (AOCS) (75) ont standardisé cette procédure qui est applicable à toutes les graisses et huiles. D'autres auteurs ont proposé des modifications de cette méthode. Timmen (76) effectue un titrage à lumière indirecte sous azote ou gaz carbonique. Sully (77) propose une procédure modifiée. Le mélange de solvants (chloroforme et acide acétique glacial 1 + 1 (V/V)) est d'abord désaéré par

chauffage à la température d'ébullition en présence d'iodure de potassium comme précontrôle d'une oxydation éventuelle. Après addition de la MG à chaud, on effectue la réaction à l'ébullition et le titrage à froid après addition d'eau et refroidissement. La *Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft* (DGF) (78) a standardisé le dosage des peroxydes selon les procédures de Wheeler (73) et de Sully (77). Swoboda et Lea (79) effectuent une détermination colorimétrique des complexes de iodure de cadmium et de iode-amidon obtenus par réaction du iode libéré avec de l'acétate de cadmium ou de l'amidon. Pour abaisser la limite de détection du dosage des peroxydes, Fiedler (80) détermine le iode libéré par réduction sur une électrode de platine maintenue à un potentiel constant. Cette modification permet de mesurer des valeurs d'IP se situant entre 0,06 et 20 méquivalents de peroxydes par kg de MG. Récemment, Hara et Totani (81) ont mis au point un titrage potentiométrique qui permet de mesurer l'IP à partir de faibles quantités de lipides (≥ 10 mg). La limite de détection de cette méthode est d'environ 20 nanoéquivalents de peroxydes par kg de MG.

Le deuxième groupe de méthodes est basé sur l'oxydation du fer (II) en fer (III) par les peroxydes suivie d'un dosage photométrique du Fe (III) sous forme du complexe rouge de thiocyanate de fer (III). Chapman et Mc Farlane (82) ont présenté en 1943 une méthode de dosage des peroxydes dans la MG de poudres de lait entier. Cette méthode a été largement utilisée dans les produits laitiers en raison de la sensibilité insuffisante du mode opératoire iodométrique pour la MG laitière (71, 84, 87). Lips et al (83) ont adapté cette méthode pour son application à toutes les huiles et graisses. Le dosage est effectué dans l'acétone à env. 96 % et sous lumière rouge en raison de l'intensification de la coloration provoquée par la lumière naturelle. Hills et Thiel (84) proposent un mélange de benzène / CH_3OH 7 + 3 (V/V) en raison de la faible solubilité de la MG laitière dans l'acétone à 96 %. Ces auteurs ont appliqué leur méthode au lait, à la crème, au beurre et aux poudres de lait. Holloway (85) a testé cette méthode et suggère de déterminer en plus une valeur à blanc avec de la MG pour compenser une coloration rouge formée par des composants de l'huile de beurre. La *Fédération Internationale de*

Laiterie (FIL) (86) décrit une méthode applicable à la MG déshydratée ayant un indice de peroxyde inférieur ou égal à 1,0 milliéquivalent d'oxygène par kg de MG. La MG anhydre est dissoute dans un mélange de chloroforme/méthanol 7+3 V/V. La différence absolue entre les résultats d'une détermination à double ne doit pas excéder 0,05 unité.

Hamm et al. (87) ont mis au point un test très sensible pour la détermination de l'IP des lipides. La MG est dissoute dans du 1,1,2,2-tétrachloréthane auquel on ajoute une solution de 1,5-diphénylcarbazine ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNHCONHNHC}_6\text{H}_5$) dans l'acide acétique. Les peroxydes et l'oxygène peuvent oxyder le carbazine en 1,5-diphénylcarbazonne ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N=NCONHNHC}_6\text{H}_5$) de couleur rouge. On mesure l'intensité du colorant à 565 nm. Selon Hamm et Hammond (88), cette méthode est plus sensible que les méthodes iodométrique et au thiocyanate de fer et est appropriée au dosage des peroxydes lors des premières étapes de l'autooxydation des graisses. Selon Gray (39), cette méthode est très empirique. Des changements de l'ordre d'addition des réactifs, de la température et de la durée de chauff-

Tableau 2 Principes de base des méthodes de dosage de l'indice de peroxyde selon divers auteurs

Principes de bases	Déterminations	Références
Dissolution de la MG dans un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ glacial 1 + 2 (V/V). Addition de KI solide. Agitations et chauffages répétés. Le mélange est versé dans une solution aqueuse de KI (5g/L).	Iodométrique. Indicateur: aucun	Lea (72)
Dissolution de la MG dans un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ glacial 2 + 3 (V/V). Addition d'une solution de KI saturée dans l'eau.	Iodométrique. Indicateur: amidon	Wheeler (73), AOAC (74), AOCS (75), Timmen (76), DGF (78)
Chauffage à ébullition d'un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ glacial 1 + 1 (V/V). Addition, en maintenant l'ébullition, d'une solution aqueuse de KI, puis de la MG.	Iodométrique. Indicateur: amidon	Sully (77), DGF (78)
Dissolution de la MG dans un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ glacial 2 + 3 (V/V). Désaération par un courant de CO_2 . Additions d'une solution aqueuse de KI puis d'une solution d'acétate de cadmium et centrifugation.	Colorimétrique du $\text{Cd}(\text{I}^3)_2$	Swoboda et Lea (79)
Alternative: Addition supplémentaire d'une solution aqueuse d'urée/amidon		
Dissolution de la MG dans un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ glacial 2 + 3 (V/V). Addition d'une solution de KI saturée dans l'eau.	du complexe I_2 /amidon Potentiométrique	Fiedler (80)
Dissolution de la MG dans un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ glacial 2 + 3 (V/V). Désaération par un courant d'azote ou par du CO_2 . Addition d'une solution de KI saturée dans l'eau.	Potentiométrique	Hara et Totani (81)
Extraction à chaud de poudres de lait dans l'acétone anhydre, filtration. Addition de $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2](\text{SO}_4)_2$ et de NH_4SCN dans un mélange d'acétone à 96 %. Réaction à chaud.	Colorimétrique du $\text{Fe}[(\text{SCN})_6]^{3-}$	Chapman et Mc Farlane (82)
Dissolution à chaud de la MG dans l'acétone anhydre. Addition d'une solution de $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2](\text{SO}_4)_2$ et de NH_4SCN dans un mélange d'acétone à 96 %. Réaction à chaud.	Colorimétrique du $\text{Fe}[(\text{SCN})_6]^{3-}$	Lips et al. (83)
Dissolution de la MG dans un mélange de benzène/ CH_3OH 7 + 3 (V/V). Additions de solutions aqueuses de NH_4SCN puis de FeCl_2 . Réaction à chaud.	Colorimétrique du $\text{Fe}[(\text{SCN})_6]^{3-}$	Hills et Thiel (84) Holloway (85)
Dissolution de la MG dans un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ anhydre 7 + 3 (V/V). Additions de solutions aqueuses de NH_4SCN puis de FeCl_2 .	Colorimétrique du $\text{Fe}[(\text{SCN})_6]^{3-}$	FIL (86)
Dissolution de la MG dans du 1,1,2,2-tétrachloréthane. Addition de 1,5-diphénylcarbazine dans CH_3COOH .	Colorimétrique de la diphénylcarbazonne	Hamm et al. (87), Hamm et Hammond (88)

Abréviations: AOAC: Association of Official Analytical Chemists; AOCS: American Oil Chemists' Society
DGF: Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft

fage, de la concentration en acide acétique et de la polarité des solvants modifient les résultats analytiques.

D'une manière générale, l'IP peut être considéré comme un bon indicateur de l'oxydation des lipides, surtout durant la période d'induction de l'autooxydation. La corrélation entre les valeurs de l'IP et les flaveurs d'oxydation ne sont toutefois pas toujours significatives en raison de la formation et décomposition simultanées des peroxydes (40, 71).

Dosages spectrophotométriques

Dosage des diènes conjugués

L'oxydation des acides gras polyinsaturés des glycérides conduit à la formation d'hydroperoxydes constitués de groupes diéniques conjugués ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}- \rightarrow -\text{CH}(\text{OOH})\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}-$) qui ont une forte absorption à 234 nm ($\epsilon = 26000$). Cette méthode est très répandue pour contrôler la qualité des lipides lors du blanchiment d'huiles végétales, procédé qui conduit à la formation de diènes, triènes et tétraènes absorbant respectivement à 234, 274 et 392 nm. Les diènes conjugués sont habituellement mesurés en dissolvant les lipides dans des solvants apolaires par rapport à une solution d'ester méthylique de l'acide palmitique pour éliminer les interférences de divers groupes fonctionnels (carboxyliques, ester et éthylène) qui se présentent sous forme d'épaule et réduisent la sensibilité de la méthode (29). Cette méthode a été appréciée par divers auteurs. Farmer et Sutton (89) indiquent que l'absorption UV augmente proportionnellement à la consommation d'oxygène et à la formation de peroxydes dans les premières étapes d'oxydation. Privett et Blank (90) ont démontré que le plateau de la courbe UV (Absorption UV en fonction du temps d'oxydation) se situe toujours juste avant la fin de la période d'induction. St Angelo et al. (91) ont employé cette méthode pour déterminer la stabilité à l'oxydation de beurres d'arachide. Selon ces auteurs, la méthode des diènes conjugués est plus précise, plus rapide et plus simple que l'IP. Yanishlieva et Popov (92) proposent des valeurs d'extinction limites à 232 nm pour caractériser la qualité d'huiles végétales en fonction du degré d'insaturation. Si on veut utiliser ces valeurs tabulaires, on doit cependant tenir compte de la composition en acides gras insaturés des lipides. Brown et Snyder (93) ont tenté d'identifier diverses fractions de diènes conjugués d'huiles de soja séparées par HPLC. Atramentova (94) affirme que l'analyse des diènes est rapide et précise pour la détermination de la stabilité à l'oxydation des lipides du lait. Parr et Swoboda (95) ont décrit une procédure pour déterminer l'oxydation dans les aliments entreposés.

Les hydroperoxydes des acides gras polyéniques et leurs dérivés hydroxylés et carbonylés sont convertis en chromophores pluriconjugués par réduction avec du borhydru de sodium et déshydratation. Les résultats de ces «Conjugable Oxidation Products (COP)» sont exprimés sous la forme d'indices de COP. La réduction avec du borhydru de sodium fait disparaître l'absorption UV à 275 nm due aux composés carbonylés des acides gras polyéniques oxydés (oxodiènes). La disparition de cette absorption est appelée la valeur oxodiène. Cette méthode permet de distinguer entre les produits d'oxydation provenant des acides diéniques de ceux provenant des acides polyéniques plus insaturés (Rapport COP). Divers auteurs concluent que la quantification des diènes conjugués ne peut être utilisée comme une mesure absolue de l'oxydation des lipides. Selon Nawar (13), l'ampleur de l'augmentation de l'absorption UV n'est pas toujours liée au degré d'oxydation sauf dans les premières étapes du processus d'oxydation. Holman et Burr (96) et Cerny (12) estiment que cette méthode ne peut être employée que si la composition en acides gras des lipides mesurés est connue. Selon Prior et Löliger (29), tous les hydroperoxydes n'ont pas des diènes conjugués (par exemple les hydroperoxydes de l'acide oléique). On trouve également des diènes dans des alcools lipidiques et des acides gras insaturés. Bien que cette méthode soit simple et donne rapidement une indication sur l'étendue de l'oxydation, ces auteurs recommandent des méthodes plus spécifiques et plus sensibles.

Dosage par mesure de la fluorescence

Récemment, on a mis au point des méthodes de mesure de la fluorescence émise après oxydation de substances chimiques par les hydroperoxydes. Akasaka et al. (97) proposent d'utiliser la diphenyl-1-pyrénylphosphine (DPP) qui est oxydé par les peroxydes en DPP-oxyde fortement fluorescent. Cette méthode est environ 10'000 fois plus sensible que celle du dosage de l'IP par iodométrie. Ces auteurs ont déterminé une bonne corrélation entre les résultats ob-

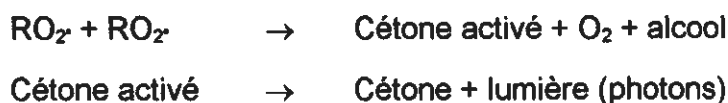
tenus avec cette méthode et ceux obtenus par iodométrie ($r = 0.9995$, $n = 41$). Pérez-Ruiz et al. (98) proposent une oxydation de la leucophloxine en phloxine fluorescente. Ces auteurs ont démontré l'applicabilité de leur méthode au dosage des peroxydes dans des huiles et dans des laits. Les méthodes de dosage des peroxydes par mesure de la fluorescence sont connues comme étant très sensibles. Cependant, la présence d'antioxydants peut diminuer l'intensité de la fluorescence.

Dosage par mesure de la chimiluminescence (CL)

L'oxydation des lipides est accompagné par une émission spontanée de photons due à une décomposition des radicaux peroxy et des dioxétanes (40, 99, 100). Cette émission est une propriété pratiquement universelle des substances organiques oxydées. Elle est générée par des substances activées, engendrées par les réactions radicalaires, qui émettent des photons en retournant à l'état fondamental. La figure 4 présente le mécanisme réactionnel de l'étape d'émission lumineuse proposée par Vassil'ev (100).

Ces photons peuvent être dénombrés à l'aide de photomultiplicateurs (101-103) ou de compteurs à scintillations (104, 105). Klebanov et al. (101) ont étudié l'oxydation des lipides des membranes des globules gras du lait. Le flash de luminescence a été reporté graphiquement et les résultats interprétés mathématiquement. Divers auteurs rapportent des corrélations étroites entre le degré d'oxydation et la CL. Ces mesures ont été effectuées dans des membranes de globules gras du lait (101), des huiles de soja (102), des poissons (103) et du lait et des poudres de lait (104, 105). Dans les poudres de lait, Timms et al. (104) n'ont cependant pu détecter qu'une très faible CL, juste en dessus du bruit de fond. Par contre, les laits reconstitués émettaient des CL facilement mesurables. Selon Prior et Löliger (29), les poudres de lait devraient encore être chauffées au moins à 50° C pour obtenir un signal détectable. Timms et Roupas (105) ont mesuré la CL émise par les lipides du lait entreposés à différentes températures. La CL augmen-

Figure 4 Mécanisme de réaction de l'étape d'émission par chimiluminescence selon Vassil'ev (100)



Abréviation:

RO₂ : Radical d'un peroxylipide

te après une faible diminution initiale et est étroitement corrélé à l'oxydation déterminée par des méthodes chimiques et sensorielles. Miyazawa et al. (106) ont développé un système couplé CL-HPLC pour la détection spécifique d'hydroperoxydes de la phosphatidylcholine. Ces auteurs ont employé une solution de luminol-cytochrome c comme réactif luminescent spécifique pour les hydroperoxydes. La limite de détection de leur méthode est de 7 nmol d'hydroperoxydes de phosphatidylcholine. Selon Prior et Löliger (29), le grand avantage de la séparation par HPLC réside dans l'élimination de substances interférentes, tels des antioxydants, qui réduisent la CL. Selon divers auteurs (28, 107), le dosage de l'oxydation par CL constitue une méthode rapide, sensible, qui ne demande aucun prétraitement des échantillons mais qui comporte encore des points faibles résidant dans la faible émission de CL et le besoin d'un appareillage sophistiqué.

Dosage des hydroperoxydes par chromatographie

Des techniques de chromatographie liquide-liquide (HPLC) et gaz-liquide (GC) ont été employées pour la séparation et le dosage des peroxydes. Ces méthodes ont été essentiellement utilisées dans les tissus biologiques et on ne connaît que peu d'applications aux lipides des denrées alimentaires.

Dosage par chromatographie liquide-liquide (HPLC)

Prior et Löliger (29) décrivent deux techniques HPLC développées dans leurs laboratoires. La technique la plus simple est une microméthode (Quantité injectée: ca. 4 mg de lipides) qui permet un dosage global des hydroperoxydes les plus importants. On dissout les lipides dans l'hexane et on sépare les triglycérides oxydés des non oxydés sur une phase normale de Nucléosil 100-3. La séparation dure 10 minutes. Les hydroperoxydes plus polaires tels que ceux des phospholipides restent adsorbés sur la colonne. La détection est effectuée par un détecteur UV-Vis à 234 nm. L'utilisation d'une telle longueur d'ondes implique qu'on ne mesure que les diènes conjugués des hydroperoxydes des acides linoléique et linolénique. Selon ces auteurs, cette analyse est en général suffisante car on dose les hydroperoxydes les plus représentatifs formés dans les aliments oxydés. La corrélation entre les hydroperoxydes (y) et l'IP (x) ($y = 0,595x + 0$; $r = 0,969$; $n = 50$) dans diverses variétés d'huiles végétales est linéaire jusqu'à une certaine concentration en hydroperoxydes. En dessus de cette concentration, l'augmentation de l'IP est plus forte que

celle des hydroperoxydes en raison de la formation d'autres peroxydes. Selon ces auteurs, cette méthode est simple, rapide et devient de plus en plus une méthode de routine. Pour déterminer les composés individuels, ces auteurs (29) ont développé une méthode HPLC pour le dosage des hydroperoxydes des acides gras, des triglycérides et des phospholipides sous forme d'esters éthylés d'acides gras hydroxylés. Les lipides oxydés, dissous dans un mélange d'éthanol et d'isooctane, sont hydrolysés en acides gras et réduits en composés hydroxylés à 60°C (60 min) par une solution de borhydure de sodium dans l'isopropanol. Après évaporation des solvants sous vide, le résidu est repris dans l'hexane, centrifugé et le supernatant est analysé sur phase normale selon les conditions de la méthode précédemment citée. Grosch signale des méthodes semblables (49). Ces méthodes permettent de séparer les isomères géométriques des acides gras hydroxylés. Comme pour le dosage global, la corrélation entre les acides gras hydroxylés (y) et l'IP (x) ($y = 0,606x + 0$; $r = 0,997$; $n = 59$) dans diverses variétés d'huiles végétales est linéaire jusqu'à une certaine concentration d'acides gras hydroxylés (29). La sensibilité de ces méthodes peut être améliorée d'un facteur 10-20 par purification des acides gras hydroxylés sur colonne (29). Cette technique de concentration est particulièrement utile pour des aliments à faibles teneurs en hydroperoxydes comme les poudres de lait. Récemment, Bertolomeazzi et al. (112) ont présenté un procédé de séparation rapide sur couche mince des isomères cis-trans des hydroxydes de l'ester méthylique de l'acide oléique et de fractionnement sur phase solide des isomères séparés. La détermination des hydroxydes des diverses fractions est effectuée par HPLC et l'identification par GC-MS. Selon Prior et Löliger (29), ces techniques n'ont pas pour but de remplacer l'IP. Les valeurs obtenues dépendent de la composition en acides gras des graisses. Il s'agit plutôt de méthodes complémentaires (peu de lipides à disposition, intérêt de connaître les isomères géométriques, présence de pigments interférant sur le dosage de l'IP). La sensibilité des analyses HPLC peut être améliorée par l'utilisation de détecteurs électrochimiques plus spécifiques (29). On peut doser sélectivement les hydroperoxydes, les dérivés hydroxylés et les lipides non oxydés ne donnant pas de signaux (108). Des détections par chimiluminescence (106) ou fluorométriques (109) après réaction avec de la diphenyl-1-pyrénylphosphine ont été publiées. Selon Prior et Löliger (29), ces techniques HPLC sont prometteuses pour le dosage des produits

d'oxydation, spécialement aux faibles teneurs dans lesquelles ils sont contenus dans les aliments.

Dosage par chromatographie gaz-liquide / spectrométrie de masse (GC/GC-MS)

Les hydroperoxydes peuvent également être mesurés par GC, mais cette technique demande une dérivation. Prior et Löliger (29) ont développé une méthode de dosage des esters méthyliques des alcools des hydroperoxydes obtenus par réduction des hydroperoxydes en alcools avec du borhydure de sodium, d'une méthylation par du chlorure d'acétyle et d'une silylation de la fonction alcool. La sensibilité peut être améliorée par purification des acides hydroxylés sur colonne (29) ou en formant des pentafluorobenzylesters (110) permettant une détection par capture d'électrons (ECD) dans le domaine des picogrammes. Jarvi et al. (111) mentionnent que de faibles teneurs en hydroperoxydes, non détectables par des analyses d'IP, peuvent être déterminées par GC. Récemment, van Zoeren-Grobbe et al. (113) ont déterminé par GC-MS les concentrations en acide linoléique et en hydroperoxydes dans le lait humain et dans des aliments pour enfants prématurés. Ces auteurs ont utilisé la concentration en hydroperoxydes et le rapport hydroperoxydes / acide linoléique comme indice de peroxydation.

Dosage par polarographie

Des méthodes polarographiques ont été développées pour quantifier les peroxydes des lipides (114). Ces méthodes permettent de différencier entre les structures -O-O- et -OOH et donnent des résultats plus précis que les méthodes chimiques, en particulier dans des solutions d'hydroperoxydes impures en raison de leur plus grande spécificité pour les peroxydes (115). La précision de cette technique est d'environ 5 % (coefficient de variation) pour des lipides ayant un IP égal ou supérieur à 5. On obtient en général une corrélation linéaire entre les résultats polarographiques et de l'IP durant les premières étapes de l'oxydation. Selon Gray (39), ces méthodes paraissent être très utiles pour l'étude de la formation des peroxydes durant les premières étapes de l'oxydation mais ne sont que peu utilisées dans l'industrie pour les contrôles de qualité.

Dosage des oxiranes

Les oxiranes contenant une fonction époxyde en position α sont formés durant le processus d'autooxydation des lipides. Ces α -époxydes sont le plus souvent dosés par titrage en retour d'un ajout en excès d'acide halogéné et la teneur en

oxiranes est calculée en fonction de l'acide consommé. La figure 5 présente le mécanisme réactionnel.

La méthode de titrage des oxiranes par l'acide bromhydrique a été adoptée par l'*American Oil Chemists' Society* (116) après un essai collaboratif effectué auprès de 5 laboratoires (117). Selon Gray (39), cette méthode est considérée comme particulièrement utile pour la détermination des époxydes dans les graisses chauffées contenant environ 0.1 g d'oxiranes / 100 g. Selon Nawar (13), ce dosage est peu sensible et manque de spécificité. Les acides halogénés peuvent aussi réagir avec des produits carbonyles α , β -insaturés et des diénols conjugués et les époxydes en configuration trans ne réagissent pas quantitativement. Une méthode colorimétrique, basée sur la réaction des oxiranes avec de l'acide picrique semble être plus sensible et moins sujette à ces interférences (118, 119).

Autres types de dosage

Les peroxydes des lipides peuvent être mesurés par des méthodes indirectes en dosant leurs produits de décomposition. Ulberth et Rubicek (120) proposent de décomposer les peroxydes par chauffage des lipides sous gaz inerte (N_2) dans un tube fermé à 130°C pendant 30 min. Les composés volatils générés (pentane, hexanal et trans-2-hepténal) sont quantifiés par GC dans l'espace de tête. La répétabilité (coefficient de variation) de cette méthode est <7%. Frankel et al. (168) rapportent des essais de décomposition thermique des hydroperoxydes placés directement dans l'injecteur du GC-MS. D'autres méthodes de dosage des produits d'oxydation primaires ont été appliquées, telles la spectrophotométrie infrarouge basée sur l'apparition, l'augmentation et la disparition de bandes dues aux peroxydes, aux radicaux, à des polymérisations et à des groupes C=O (121, 122) ou de l'indice de réfraction (123). Cependant, ces méthodes ne donnent que des indications qualitatives sur la formation des peroxydes et ne sont par conséquent que peu appliquées pour le contrôle de qualité des lipides.

Dosage des produits d'oxydation secondaires

Pour le dosage des produits secondaires, on fait surtout appel à des dosages spectrophotométriques de dérivés colorés ou à des dosages plus spécifiques par chromatographie.

Dosages spectrophotométriques

Dosage par le test de Kreis

Le test de Kreis (124) a été un des premiers tests développé pour l'évaluation de l'oxydation des lipides (13, 28, 39, 40). Le principe de la méthode repose sur la réaction des lipides oxydés avec du phloroglucinol dans l'éther diéthylique en milieu acide chlorhydrique. Il se forme un colorant de couleur rouge qui est un produit de condensation du phloroglucinol avec divers produits d'oxydation tels que l'épihydrinealdéhyde (2,3-époxypropenal), l'acide malonique et divers acétals (125). L'intensité de la coloration peut être mesurée par comparaison visuelle avec des standards de permanganate (72). Une détermination spectrophotométrique est cependant généralement employée car elle permet de mieux différencier la coloration formée par des produits d'oxydation de celle provenant de certains constituants naturels des huiles et graisses (73). Des additifs alimentaires, comme la vanilline, peuvent également interférer sur les dosages (28). En raison du manque de spécificité de la réaction, une faible coloration rose ne constitue pas nécessairement une preuve de la présence de produits d'oxydation. Cette méthode a été standardisée comme *Standard britannique* (126). Selon Brown et Thurston (127), ce test présente les avantages d'être rapide et de donner des indications sur une oxydation naissante. Selon Gray (39), il est difficilement reproductible et ne constitue pas toujours la preuve d'une oxydation.

Dosage par le test à l'anisidine (TA)

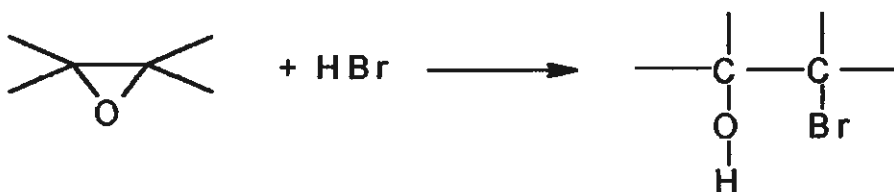
La première méthode a été développée par Holm et al. (128) pour le dosage des aldéhydes produits par oxydation des lipides. Le principe de cette méthode re-

pose sur la réaction des aldéhydes avec de l'acétate de benzidine (128). Cette méthode a été critiquée en raison du caractère cancérigène de la benzidine. Ce réactif a été remplacé par de la p-anisidine (129, 130). Pour le dosage, on dissout habituellement la MG dans l'isooctane ou l'hexane et on y additionne une solution de p-anisidine dans l'acide acétique glacial (132). L'intensité du colorant jaunâtre formé est mesurée photométriquement à 350 nm. Il est important que les échantillons et les réactifs soient anhydres. Des traces d'eau éventuellement présentes dans l'acide acétique glacial peuvent être éliminées par addition d'anhydride acétique. Ce test mesure la teneur en aldéhydes présents dans une graisse, principalement des 2-alcénals. Le maximum d'absorption et l'intensité de la coloration peuvent varier en fonction de la structure des aldéhydes. Le maximum d'absorption se déplace vers des longueurs d'ondes plus élevées à mesure que le degré d'insaturation des aldéhydes augmente et le coefficient d'extinction molaire est plus élevé si les aldéhydes sont constitués d'une double liaison conjuguée à la liaison carbonyle (diénals) (13). Ce test a été standardisé par l'*International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* (131). Pour les lipides du lait, Sattar et al. (133) ont trouvé le TA insatisfaisant pour suivre la détérioration oxydative alors que Timms et Roupas (105) l'ont utilisé avec succès pour évaluer la stabilité à l'oxydation durant l'entreposage. Selon Rossell (28), le TA est particulièrement utile pour des huiles fortement endommagées comme des huiles de friture ou pour la détermination de la valeur tottox (IP + 2 TA) (28).

Dosage par le test à l'acide thiobarbiturique (TATB)

En 1944, Kohn et Liversedge (134) ont observé qu'il se développait une coloration rose lors de l'incubation aérobie de tissus d'animaux en présence d'ATB. Bernheim et al. (135) ont trouvé que cette coloration provenait d'un complexe formé entre des produits d'oxydation des lipides insaturés et l'ATB. Dès lors, cette réaction a fait l'objet de nombreuses études. Selon divers auteurs (136-138), il apparaît que l'aldéhyde malonique, un produit de l'oxydation des lipides, soit le réactif principal de la réaction avec l'ATB. Selon Gray (39), rien ne permet d'affirmer que l'aldéhyde malonique soit présent dans tous les systèmes oxydés. Dahle et al. (139) ont proposé un mécanisme hypothétique suivant lequel seuls les acides gras comportant au moins trois double liaisons pourraient former de l'aldéhyde malonique. Selon d'autres auteurs (140-142), d'autres substances telles que des aldéhydes α , β -insaturés (p. ex. des 4-

Figure 5 Mécanisme de réaction des oxiranes avec l'acide bromhydrique



hydroxycalcénols) et divers précurseurs non volatils non identifiés de ces substances peuvent également développer des colorations avec l'ATB. Les aldéhydes α , β -insaturés ont toutefois un coefficient d'extinction molaire environ 1000 fois plus petit que celui du colorant formé avec l'aldéhyde malonique (143). Selon Sinnhuber et al. (136), le colorant est un produit de condensation constitué de deux molécules d'ATB et d'une molécule d'aldéhyde malonique. Yu et al. (144) ont récemment confirmé cette structure chimique en utilisant un équipement moderne (spectrométrie de masse, spectrométrie infrarouge avec transformation de Fourier et chromatographie liquide-liquide). La figure 6 présente le mécanisme de réaction de l'ATB avec l'aldéhyde malonique selon Sinnhuber et al. (136).

De nombreuses méthodes ont été publiées en raison surtout de la corrélation incertaine entre les résultats analytiques et les saveurs d'oxydation. Hoyland and Taylor (145) et Ward (146) ont publié respectivement en 1985 et 1991 des revues bibliographiques sur ce test. Selon Hoyland et Taylor (145), les méthodes publiées peuvent être subdivisées en quatre groupes suivant la matrice sur laquelle le dosage est effectué. Les analyses peuvent être effectuées sur l'échantillon entier (147, 148), sur un extrait aqueux ou acide (140, 149), sur un distillat à la vapeur d'eau (132, 150) ou sur un extrait lipidique (151, 152). Les méthodes de dosage sur l'échantillon entier présentent l'avantage de pouvoir déterminer des produits d'oxydation qu'on ne peut pas doser avec les autres méthodes. Cette technique demande cependant plus de temps car on doit le plus souvent effectuer plusieurs extractions du pigment. (28, 145). Dunkley et Jennings (149) ont publié en 1951 une méthode adaptée au lait. Après chauffage d'un mélange de lait et d'ATB, on extrait le colorant par un mélange d'alcool isoamylique / pyridine 2 + 1 (V/V). L'intensité de la coloration est mesurée à 535 nm. Sidwell et al. (153) effectuent une détermination en milieu acide. King (154) élimine l'alcool isoamylique et la pyridine en effectuant le TATB sur un extrait aqueux et acidifié. Ces auteurs proposent une précipitation des protéines et des lipides du lait avec de l'acide trichloracétique en présence d'alcool suivi d'une filtration. Le TATB est effectué sur le filtrat. Les méthodes de Dunkley et Jennings (149) et King (154) ont été intensivement utilisées pour l'étude de l'oxydation des lipides des produits laitiers. (71, 155, 156). Quant aux méthodes de distillation, elles présentent l'avantage de réduire les interférences, d'être rapide, de donner des résultats répétables et d'être applicables à tous les aliments (145). Rossell (28) préfère la mé-

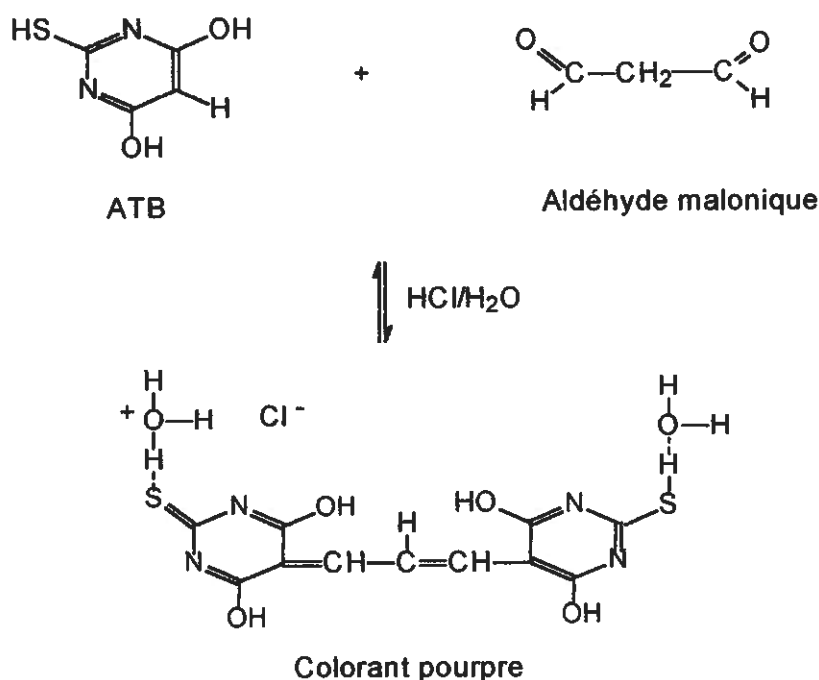
thode publiée dans le «*Pearson's Chemical Analysis of Foods*» (132). L'aliment est d'abord macéré dans l'eau. Après adjonction d'acide chlorhydrique et d'un antimoine, le mélange est distillé. Une partie aliquote du distillat est mise en réaction avec de l'acide thiobarbiturique dans l'acide acétique glacial. Il se forme un colorant rouge qui est mesuré à 538 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'aldéhyde malonique par kg d'échantillon. Hoyland et Taylor (150) propose une méthode de distillation rapide permettant une réduction significative de la durée d'analyse par rapport aux autres méthodes de distillation existantes. En ce qui concerne les analyses effectuées sur les lipides extraits, Pikul et al. (152) recommandent particulièrement cette technique pour l'étude de lipides de compositions différentes. Divers auteurs (157, 158) ont développé des méthodes de dosage spécifique de l'aldéhyde malonique par chromatographie liquide-liquide. Cependant, ces méthodes donnent de mauvaises corrélations avec les saveurs d'oxydation en raison d'un seul composé déterminé (145).

La détermination des colorants par spectrophotométrie permet de réduire diverses interférences et de distinguer entre différents groupes d'aldéhydes en choisissant correctement la longueur d'ondes. On mesure généralement la coloration rose entre 530-537 nm (145). Cependant, les réactions avec l'ATB peuvent produire des colorations jaunes (environ 450 nm), oranges (environ 490 nm)

et roses (environ 530 nm) selon les réactants et les conditions de réaction (142, 145, 159). La couleur jaune est attribuée à la dégradation acide de l'ATB, à divers aldéhydes aliphatiques saturés et monoinsaturés ou aromatiques alors que la couleur rose est principalement due à des 2,4-alcadiénols et 2-alcénols (28, 145, 160). Quant aux aldéhydes α , β -insaturés, ils donnent des colorants qui absorbent à 535 nm (143).

Différents auteurs (145, 146) ont critiqué le TATB en raison de nombreuses interférences. La présence de cuivre et de fer augmente de manière marquante l'intensité de la coloration dans la phase organique (141, 145, 149). L'aldéhyde malonique peut réagir avec des protéines et conduire à des valeurs anormalement faibles (13). Le réactif à l'ATB est sensible à la chaleur, à l'acidité et à des agents d'oxydation (138, 149). Enfin, diverses autres substances comme des lipides insolubles, l'urée, des sucres et des protéines oxydées peuvent également développer des colorations (28, 134, 135, 145, 146, 161). Lillard et Day (162) ont cependant mis en évidence des corrélations significatives entre les résultats du TATB et les saveurs d'oxydation des lipides du beurre. Selon Hegenauer et al. (163), cette méthode constitue un test de présélection rapide et bon marché mais il ne remplace pas les méthodes sensorielles. Selon la FIL (4), le TATB a été fréquemment utilisé pour mesurer l'étendue de l'oxydation des lipides du lait mais les résultats obtenus sont parfois faiblement

Figure 6 Mécanisme de réaction de l'aldéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique (ATB)



corrélés avec les données organoleptiques. Hoyland et Taylor (145) concluent que le TATB n'est pas applicable pour suivre la détérioration oxydative des lipides en raison de l'augmentation puis de la diminution des valeurs durant l'entreposage alors que les tests organoleptiques montrent une augmentation continue du processus d'oxydation. Par contre, ces auteurs estiment que ce test est applicable comme indice d'oxydation et que les méthodes par distillation devraient être préférées en raison de la diminution des substances interférentes que ce processus provoque.

Détermination de l'indice de carbonyle

La détermination des composés carbonylés totaux produits par dégradation des hydroperoxydes constitue une autre façon de doser des produits d'oxydation secondaires des lipides. La méthode la plus précise et la plus répandue est celle proposée par Henick et al. (164). Son principe est basé sur la formation des 2,4-dinitrophénylhydrazones des composés carbonylés en présence d'acide trichloracétique comme catalyseur. La détection colorimétrique est effectuée entre 430 et 460 nm. Cette procédure a été cependant critiquée (13, 39, 40, 170) en raison de la formation de nouveaux composés carbonylés par décomposition des hydroperoxydes selon les conditions expérimentales proposées. Différentes procédures alternatives ont alors été testées comme celle de Fioriti (166) qui propose une diminution des interférences des hydroperoxydes en effectuant la réaction à froid (5° C), celles de Mizuno et Chipault (165) et Chiba et al. (171) qui proposent des réductions des hydroperoxydes respectivement en composés non carbonylés avec du chlorure d'étain (II) et en alcools avec de la triphénylphosphine. Cependant, la réaction à froid est longue (20 heures) et la réduction avec de l'étain peut provoquer la formation de nouveaux composés carbonylés (171). Quant à la réduction avec de la triphénylphosphine, ces auteurs affirment que ce réducteur et ses produits d'oxydation ne provoquent aucune interférence et que leur technique est applicable à l'étude de toutes les étapes de l'oxydation des lipides. On a aussi proposé d'isoler les composés carbonylés par distillation sous vide (170) ou à l'aide du réactif de Girard (chlorhydrate de triméthylaminoacétylhydrazide) qui forme des imines solubles dans l'eau. L'isolation par le réactif de Girard a été recommandée (169) mais pas celle par distillation en raison de la décomposition des hydroperoxydes que ce processus provoque. Dans le fromage, Day et al. (167) proposent une extraction des composés car-

bonylés du fromage par distillation sous pression réduite. Les 2,4-dinitrophénylhydrazones sont isolés par chromatographie de partition sur colonne et quantifiés par spectrophotométrie à la longueur d'ondes d'absorption maximale des divers hydrazones.

Selon Gray (39), l'indice de carbonyle donne essentiellement des indications sur le degré d'oxydation des lipides car les résultats analytiques sont peu corrélables avec les saveurs d'oxydation en raison de la présence majoritaire de composés carbonylés non volatils pratiquement sans saveurs. Certaines méthodes sont très sensibles et leur emploi n'est pas limité aux premières étapes de l'oxydation comme l'indice de peroxyde par exemple. Du point de vue analytique, il est cependant nécessaire d'établir les conditions expérimentales de façon à ne pas provoquer une décomposition des peroxydes afin que les résultats analytiques correspondent à l'état sensoriel réel du produit au moment de l'analyse.

Dosage par mesure de la fluorescence

Des composés fluorescents 1 amino-3-iminopropène N,N-disubstitués ($R-N=CH-CH=CH-NH-R$) peuvent se former par interaction entre des composés carbonylés et certains constituants cellulaires tels que des groupes fonctionnels aminés libres (172, 175), des phospholipides (173) etc.. Les différents produits fluorescents formés durant l'oxydation des lipides dépendent de la nature des composés carbonylés et de celle des substituants des groupes aminés des bases de Schiff conjuguées (172, 174). Ces méthodes ont été principalement appliquées à la détermination des produits d'oxydation dans les tissus biologiques. La fluorescence se développe parallèlement à l'absorption d'oxygène, même dans les premières étapes de l'oxydation et cette technique peut être employée pour quantifier des dommages accumulés dans les tissus biologiques. On ne trouve que peu d'applications dans les denrées alimentaires et en particulier dans les produits laitiers. Bouza et al. (177) ont développé une technique d'extraction des composés fluorescents du lait à l'aide d'un mélange de chloroforme / méthanol 2 + 1 (V/V). Selon ces auteurs, leur méthode donne des résultats répétables et permet de suivre la progression de l'oxydation. Bien que ces techniques d'extraction soient simples et rapides, elles comportent toutefois le désavantage d'extraire des composés fluorescents inconnus. Des séparations sur couche mince, colonne ou par HPLC et des identifications par GC-MS seraient appropriées (29, 175). Récemment, on a mesuré la fluorescence sur des produits

solides. Weist et Karel (178) ont exposé une poudre de chitosane (un biopolymère formé de glucosamine et de N-acétyl glucosamine) aux composés volatils des lipides oxydés. Selon ces auteurs, la fluorescence formée est due à l'aldéhyde malonique volatil. Le dosage des produits d'oxydation par fluorescence n'est pas exempt d'interférences. Selon Hitchcock et Hammond (176), la vitamine A et les bases de Schiff conjuguées formées lors des réactions de Maillard peuvent interférer sur les dosages. Selon divers auteurs (13, 29, 39, 40, 176), ces méthodes sont très sensibles (elles permettent de détecter des composés fluorescents dans le domaine du mg par kg, 10-100 fois plus sensible que le TATB) et très appropriées à l'étude de l'oxydation. Cependant, les produits fluorescents devraient d'abord être séparés et identifiés afin d'optimiser cette technique prometteuse.

Méthodes chromatographiques

Les principales méthodes utilisées pour le dosage des produits d'oxydation secondaires des lipides font essentiellement appel à des techniques de dosage des composés carbonylés totaux sur couche mince, de dérivés des composés carbonylés par chromatographie liquide-liquide et des produits volatils par chromatographie gaz-liquide ou gaz-solide.

Dosage des composés monocarbonylés aliphatiques totaux par chromatographie sur couche mince

La majorité des composés carbonylés formés durant l'oxydation des lipides du lait sont peu volatils (162, 170). Des techniques ont donc été développées par divers auteurs pour déterminer les composés monocarbonylés aliphatiques volatils et non volatils le plus souvent sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazones. Keen et al. (179) ont mis au point une méthode de dosage dans les poudres de lait. Cette procédure comprend une extraction des composés carbonylés à l'aide de tétrachlorure de carbone, la formation de 2,4-dinitrophénylhydrazones, une purification des monocarbonylhydrazones (élimination des lipides et des cétylglycéridhydrazones) sur deux types de colonnes préparatives et une séparation des monocarbonylhydrazones en différentes classes (n-alcanals, 2-alcénals, 2-alcanones et 2,4-alcadiénals) sur couche mince constituée de gel de silice enduit de Seasorb 43 + célite. Boon et al. (180) ont introduit une opération supplémentaire permettant d'identifier les composés individuels par chromatographie de partition sur couche mince de gel de silice imprégné de phénoxyéthanol et de polyéthylèneglycol 400 ou de polyéthylèneglycol 600. Ces auteurs ont ainsi identifié quantitativement les composés ali-

phatiques monocarbonylés de différentes longueurs de chaîne dans les poudres de laits fraîches et entreposées (les alcanals C1-C10, les 2-alcanones C3, C4-C10, C13 et C15, les 2-alcénals C5-C12 et les 2,4-alcadiénals C5-C7 et C9-C15). Badings et Wassink (181) proposent une séparation des hyrazones des n-alcanals, n-alcanones, 2,4-n-alcénones, 2,4-n-alcénals et 2,4-n-alcadiénals par chromatographie d'adsorption sur couche mince constituée de carbonate de zinc basique. Chaque classe de composés donne une couleur caractéristique qui permet la reconnaissance visuelle des composants d'une classe. Cette séparation peut également être effectuée sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent. L'isolation et l'identification des composés monocarbonylés selon les longueurs de chaînes est effectuée par chromatographie de partition sur plaques de gel de silice imprégnée de carbowax. Cette dernière étape a été également employée par Mc Carty et Hansen (182) pour l'isolation finale des composés carbonylés individuels des lipides du lait. Badings (35) a séparé les composés carbonylés du beurre selon ces procédés. Gaba et Jain (183, 184) ont identifié plus de 20 composés carbonylés dans des beurres à l'aide de techniques similaires. Johnson et Hammond (185) propose de doser les composés carbonylés sous forme de 2,4,6-trichlorophénylhydrazones. Les 2-alcanones sont séparés des aldéhydes sur plaques d'oxyde d'aluminium et les alcanals des alcénals et des 2,4-alcadiénals sur plaques de silice ou de silice imprégnée de nitrate d'argent. La séparation selon les longueurs de chaînes est effectuée par chromatographie de partition sur plaques imprégnées de phénoxyéthanol. Ces dérivés chlorés ont permis à ces auteurs d'analyser des extraits élués des couches minces par chromatographie gaz-liquide à l'aide d'un détecteur à capture d'électrons (ECD). Bien que ces méthodes permettent de doser quantitativement aussi bien les composés carbonylés volatils que les non volatils dans le domaine du ng, elles sont longues, fastidieuses et donc peu adaptées aux dosages de routine.

Dosage des composés carbonylés par HPLC

Les méthodes HPLC les plus courantes sont basées sur le dosage des aldéhydes en tant que 2,4-dinitrophénylhydrazones. Ces techniques sont essentiellement utilisées pour les systèmes biologiques. On ne connaît que peu d'applications dans le domaine alimentaire (29). van Schalm (186) a employé cette méthode pour le dosage de la formaldéhyde dans le lait. Cet aldéhyde est extrait par distillation à la vapeur d'eau du lait acidifié, converti en

hydrazone et dosé par HPLC sur phase inversée C18-RP à 350 nm. Reindl et Stan (187) proposent une extraction et une dérivation simultanée des aldéhydes des aliments par distillation sous vide à travers une trappe contenant du 2,4-dinitrophénylhydrazine. La séparation des hydrazones est effectuée sur une phase inversée C18-RP à la température de 50° C à l'aide du mélange d'élution acétonitril / eau / tétrahydrofurane dans le rapport 75 + 24 + 1 (V/V/V). La détection est effectuée photométriquement à 360 nm. Le taux de récupération (domaine du mg par g) des aldéhydes constitués de plus de 5 C est supérieure à 80 % et la limite de détection de cette méthode est de 5 pmol. Lane (188) emploie une méthode semblable pour le dosage des aldéhydes dans des poissons et pâtisseries. Récemment, Koizumi et Suzuki (189) ont proposé des conditions de détection spécifique des aldéhydes (réaction «post» colonne avec du 7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole) dans lesquelles les cétones n'émettent pas de fluorescence.

Dosage des produits secondaires volatils de l'oxydation des lipides (PSVOL) par GC / GC-MS

Les PSVOL peuvent être dosés après élution des lipides déposés directement dans le « glass liner » de l'injecteur GC ou dans un dispositif spécial monté en avant de celui-ci. Durant ce processus, la tête de colonne est refroidie à basse température pour piéger et concentrer les produits volatils (*Dosage par injection directe*). Toutefois, on mesure le plus souvent les PSVOL dans l'espace de tête des emballages. On connaît également des méthodes d'extraction à l'aide de solvants, mais cette technique demande une étape de concentration pour permettre la détection des composants mineurs qui peut conduire à des pertes des substances les plus volatiles et à la formation de nombreux artefacts dus aux impuretés contenus dans les solvants (195). Quant aux constituants de l'espace de tête, ils peuvent être mesurés à l'équilibre statique (Static Head Space Gas Chromatography (SHS-GC)) ou après extraction par entraînement dynamique à l'aide d'un gaz inerte, rétention sur des adsorbants (charbon actif, Tenax, chromosorb etc.) et injection par désorption thermique (Dynamic Head Space Gas Chromatography (DHS-GC)).

Dosage par injection directe

Le tableau 3 présente quelques exemples de tels dosages. Snyder et al. (190) dispersent les lipides (env. 2ml) sur la laine de verre du «glass liner» de l'injecteur. L'élution des PSVOL est effectuée à une température de 180° C durant 5 min. Durant ce processus, l'injecteur est

en mode «splitless» et le four du GC est maintenu à -65° C. Dupuy et al. (191) effectuent l'élution d'env. 600 mg de lipides à une température de 170° C durant 40 min à l'aide d'un flux d'azote de 60 ml/min. Durant ce processus, la colonne de remplissage est maintenue à 30° C. Ces auteurs ont prouvé la validité de leur méthode en analysant par GC et par voie sensorielle des huiles de soja différemment oxydées en fonction de diverses durées d'exposition à la lumière. Les droites de régression (indices sensoriels d'oxydation / log des teneurs en PSVOL) ont été calculées pour les substances volatiles totales et pour deux produits en concentrations majeures (pentane et t-2, t-4-décadiénal). Selon ces auteurs, les coefficients de corrélation obtenus (> 0.95) prouvent que les résultats analytiques sont aussi bons, sinon meilleurs, que ceux obtenus par voie sensorielle. Warner et al. (193) ont appliqué cette méthode au dosage des PSVOL de diverses huiles végétales oxydées. Ces auteurs ont établi une équation modèle pour prédire les taux de saveurs. Cette équation prend en compte l'indice de peroxyde et le logarithme des concentrations en pentanal et hexanal. Dupuy et al. (192) ont remplacé la colonne de remplissage précitée par une colonne capillaire. Ils emploient un système spécial constitué d'une valve d'injection à 6 voies qui permet d'éluier les PSVOL en faisant passer le flux du gaz porteur sur les lipides pour les concentrer en tête de colonne puis de le diriger à travers la colonne pour la séparation. Ces auteurs effectuent l'élution d'environ 300 mg de lipides disposés sur la laine de verre du «glass liner» du système spécial (température de ce système: 200° C; température de la valve: 180° C) durant 3 min à l'aide d'un flux d'azote de 1.2 ml/min. Durant ce processus, la colonne est maintenue à -30° C. Prior et Löliger (29) dosent le pentane à partir de pesées équivalentes de lipides et de billes de verre. Min (194) introduit l'échantillon de lipides dans un tube en U connecté à la colonne de séparation. Les lipides sont élués à 160° C durant 15 min à l'aide d'un courant d'hélium de 50 ml/min. Les techniques d'injection directe donnent en général de bonnes indications sur le degré d'oxydation des lipides et permettent de calculer de bonnes corrélations entre des PSVOL et les données sensorielles. Cependant, ces méthodes sont peu applicables à l'étude de la progression de l'oxydation en raison de la décomposition des peroxydes aux températures d'élution.

Dosage dans l'espace de tête à l'équilibre statique (SHS)

Ces dosages peuvent être effectués dans l'espace de tête d'un extrait aqueux ob-

tenu par distillation à la vapeur d'eau ou directement dans celui des emballages des aliments. Le problème principal lié à cette technique est celui de la sensibilité. On doit injecter < 5 ml du volume de l'espace de tête si on veut obtenir une résolution acceptable des chromatogrammes, spécialement avec des colonnes capillaires. Les quantités minimales mesurables sont d'env. 0,1 mg / kg avec le détecteur à ionisation de flamme et d'env. 10 mg / kg avec le spectromètre de masse. Comme les concentrations en PSVOL dans l'espace de tête des aliments se situent entre 0,01 ng / kg et 100 mg / kg, cette technique n'est donc pas applicable au dosage des composés en traces (29). Le tableau 4 présente quelques exemples de dosages par SHS. L'extraction des PSVOL par distillation à la vapeur d'eau est généralement effec-

tuée en présence d'un agent antimoussant. Le distillat est introduit dans un récipient muni d'une fermeture hermétique et thermostaté à une température d'env. 60° C pour enrichir l'espace de tête en PSVOL. Bassette et Ward (195) ont mis au point une procédure simple. La distillation du lait est effectuée à l'aide d'une unité de distillation de Kemmerer-Hallett, type micro-Kjeldahl, en présence d'antimoussant GE 66. Une fraction du distillat obtenu est mélangée à du sulfate de sodium anhydre dans des fioles de sérum munies d'un septum et thermostatées à 60° C. Les constituants de l'espace de tête sont injectés dans le GC à l'aide de seringues étanches aux gaz. Cette technique permet de doser les substances volatiles dans le domaine du mg par kg. Récemment, Ulberth et Roubicek (196) proposent un appareil de distillation

constitué d'un ballon de 500 ml à deux cols relié à un tube doté d'une tête antiéclaboussures et d'un réfrigérant du type Allihn. Ces auteurs ont distillé des émulsions aqueuses de poudres de lait en présence de silicone comme antimoussant. Une fraction du distillat est mélangée à du chlorure de sodium dans des fioles munies de septum en téflon et thermostatées durant 60 min à 60° C. Selon ces auteurs, l'hexanal est le meilleur indicateur du processus d'oxydation. Les poudres de lait fraîches contiennent <10 mg kg⁻¹ d'hexanal alors que des poudres entreposées peuvent en contenir > de 28 mg kg⁻¹. Les extraits aqueux doivent parfois être concentrés pour améliorer la résolution des composants mineurs. Forss et al. (197) ont décrit deux méthodes de concentration des composés volatils à partir de solutions aqueuses diluées. La

Tableau 3 Méthodes de dosage des composés volatils mesurés sur des huiles végétales oxydées placés directement dans l'injecteur du GC

Colonnes de séparation	Composés principaux déterminés	Références
Durabond 5	Pentane, hexanal, 2-hepténal, 2,4-heptadiénal, 2,4-décadiénal	Snyder et al. (190)
Tenax (10 % polyméthacrylate de styrène-phénoxyène)	Pentane, hexane, pentanal, hexanal, t-2, c-4-heptadiénal, t-2, t-4-heptadiénal, t-2, c-4-décadiénal, t-2, t-4-décadiénal	Dupuy et al. (191)
HP (5 % phénylméthylsilicone)	Acétone + pentane, pentanal + heptane, hexanal + octane, t-2-hepténal, 2,3-octadione, t-2, c-4-heptadiénal, 2-décénal, t-2, c-4-décadiénal, t-2, t-4-décadiénal, tétradécane	Dupuy et al. (192)

Abréviations: HP: Hewlett Packard
GC: Gaschromatograph

Tableau 4 Méthodes de dosage des composés volatils mesurés par « Static Headspace Gaschromatography » (SHS-GC)

Produits analysés	Conditions de l'essai	Techniques d'échantillonnage	Phases stationnaires	Composés déterminés	Références
Beurre	Entreposage à -20, 5 et 15 °C durant 12 mois	SHS-GC direct	10 % PEG 1540 sur Diasolid L	Acétaldéhyde, acide butyrique, diacétyl, aldéhyde propionique	Tanimura et al. (198)
Poudre de lait	Entreposage durant 2 mois à 20 °C	SHS-GC	Oxyde d'aluminium	Ethane, propane, butane, pentane	Löliger (50)
Lait	Développement de méthode	Distillation à la vapeur d'eau + SHS-GC	Carbowax 20 M	Acétaldéhyde, propanal, 2-pentanone, 2-hexanone, sulfure de méthyle	Bassette et Ward (195)
Poudre de lait	Entreposage durant 130 jours à diverses températures	Distillation à la vapeur d'eau + SHS-GC	SE-54	Pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal + composés 2-cétoniques non quantifiés	Ulberth et Rubicek (196)
Lait	Addition de cuivre et exposition à la lumière	Distillation à la vapeur d'eau + SHS-GC	Carbowax 20 M	Acetal ¹⁾ , propanal, n-pentanal ¹⁾ , n-hexanal ²⁾	Jeng et al. (200)
Lait UHT	Entreposage pendant 24 semaines à 2 et 25 °C	Distillation à la vapeur d'eau + SHS-GC	Supelcowax 10	Acétaldéhyde ³⁾ , propanal, n-butanal, n hexanal, acétone ³⁾ , 2-butanone, 2-pentanone ³⁾ , 2-hexanone, 2-heptanone ³⁾	Rerkrai et al. (59)
Lait UHT	Entreposage durant 3 mois à 2-5 °C et à 25 °C	Distillation à la vapeur d'eau + SHS-GC	Carbowax 20 M	Acétaldéhyde ³⁾ , n-pentanal ³⁾ , n-hexanal ³⁾	Bassette et Jeon (201)

¹⁾ Composés dont les teneurs augmentent le plus sous l'influence de la lumière

²⁾ Composés dont la teneur augmente le plus après addition de cuivre

³⁾ Composés pouvant ensemble correspondre au mieux à la flaveur d'oxydation

Abréviation: PEG: Polyéthylène glycol

première méthode est une distillation sous pression réduite (< 20 Torr) applicable à un large domaine de volumes (env. 5-5000 ml). La seconde met en jeu une sublimation des composés volatils sous haut vide et est appropriée pour l'obtention de faibles volumes concentrés de composés à bas points d'ébullition.

D'autres auteurs ont mis au point des dosages des PSVOL directement dans l'espace de tête des emballages des denrées alimentaires. Löliger (50) propose un dosage des hydrocarbures volatils (éthane et pentane) dans divers aliments, dont des poudres de lait. La prise d'échantillon est effectuée directement dans l'espace de tête d'emballages scellés à l'aide d'un système de perçage relié à un anneau de stockage d'une valve d'injection GC. Selon ces auteurs, il semble que les hydrocarbures des produits laitiers ne se forment qu'après une longue période d'entreposage. Tanimura et al. (198) ont déterminé l'acétaldéhyde, le diacétyl et l'aldéhyde propionique dans des beurres. Le beurre est thermostaté durant 20 min à 60° C en présence de chloroforme comme standard interne dans une fiole de 20 ml munie d'une fermeture constituée d'un septum. Les constituants de l'espace de tête sont injectés à l'aide d'une seringue. Selon ces auteurs, l'aldéhyde propionique peut être considéré comme un bon indicateur des flaveurs d'oxydation dans les beurres de culture. Fritsch et Gale (199) proposent une méthode rapide (10 min) de dosage de l'hexanal (standard interne: 4-heptanone) dans une suspension aqueuse chaude de farine de céréales. La prise d'échantillons des constituants de l'espace de tête est effectuée à l'aide d'une seringue. Snyder et al. (190) déterminent les composés volatils d'huiles de soja à l'aide du système d'échantillonnage HS-6 de *Perkin Elmer*. La thermostatisation de 0.5 g d'huile disposée dans une fiole hermétique de 10 ml est effectuée à 180° C durant 20 min et est suivie d'une pressurisation d'une minute. Prior et Löliger (29) emploient le système HS-40 de *Perkin Elmer* pour les dosages des aldéhydes et cétones. Ces auteurs séparent environ 50 PSVOL et appliquent leur méthode aussi bien à la détermination de la stabilité à l'oxydation qu'à celle de l'état d'oxydation à un moment particulier. Dans le lait et les produits laitiers, divers auteurs ont appliqué la procédure de Bassette et Ward (195) à l'étude des processus d'oxydation. Jeng et al. (200) ont étudié les influences de la lumière et des ions cuivre sur le processus d'oxydation du lait. Les concentrations en hexanal sont fortement dépendantes de la présence de cuivre et l'acétaldéhyde et le n-pentanal présentent l'augmentation la

plus forte lors de l'exposition à la lumière. Rerkrai et al. (59) estiment que la corrélation entre les PSVOL et la flaveur d'oxydation dépend d'une combinaison de divers composés (acétaldéhyde, acétone, 2-pentanone et 2-heptanone). Bassette et Jeon (201) ont étudié l'influence des températures et durées de chauffage sur la concentration de composés volatils de laits UHT durant l'entreposage. Durant l'entreposage à 2° C, ces auteurs n'ont pas constaté une modification significative des teneurs en PSVOL alors que durant l'entreposage à température ambiante, ils ont observé des augmentations sensibles des teneurs en acétaldéhyde, n-pentanal et n-hexanal. Hall et al. (41) ont mesuré les composés volatils de l'espace de tête de poudres de lait reconstituées selon la technique d'échantillonnage utilisée par von Sydow et al. (202). Le flacon contenant le produit à analyser est relié d'une part à un récipient contenant une solution de sulfate d'ammonium saturée et d'autre part à une cartouche de Chromosorb 105 reliée elle-même à une valve d'injection GC à huit voies comprenant une trappe refroidissable. Après équilibrage des composants volatils du lait reconstitué à 25°C, les constituants de l'espace de tête sont déplacés vers la cartouche adsorbante par remplissage du récipient contenant l'échantillon à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium saturée. Les composés adsorbés sont désorbés à 140° C et cryoconcentrés dans la trappe refroidie par de l'azote liquide avant l'injection.

Dosage après entraînement dynamique des constituants de l'espace de tête (DHS)

Les sensibilités parfois insuffisantes rencontrées avec les techniques SHS peuvent être surmontées si on utilise les techniques «purge and trap» (DHS). Cependant, les conditions d'extraction, d'adsorption et de désorption modifient fortement les résultats analytiques et doivent être par conséquent rigoureusement contrôlées (2, 29, 190). Cette technique peut comporter des désavantages. On peut avoir une décomposition des PSVOL lors de la désorption thermique, un faible taux de récupération des PSVOL à haut point d'ébullition et un transfert d'eau vers la colonne analytique provoquant des interférences sur la colonne (29). Le tableau 5 présente quelques exemples de dosage par DHS.

Divers auteurs utilisent le concentrateur «purge and trap» bien connu de la maison *Tekmar*. Selke et Frankel (203) ont employé ce système pour l'analyse des PSVOL dans des huiles de soja. Ils ont optimisé leurs conditions de dosage en maintenant l'échantillon à différentes températures d'extraction. Les PSVOL

sont extraits par entraînement à l'aide d'un flux d'hélium et piégés sur du Tenax. Selon ces auteurs, le profil des composés volatils est significativement affecté par la température d'échantillonnage. La composition relative des produits de décomposition thermique des hydroperoxydes du linoléate et du linoléinate tels que les 2,4-heptadiénal et 2,4-décadiénal augmente de manière significative si les échantillons sont chauffés en dessus de 90° C. Park et Goins (204) ont optimisé leurs conditions d'analyse avec ce même système à l'aide de solutions standards et l'ont appliqué à des produits alimentaires à base de lait. Le composant principal déterminé est l'hexanal. Les PSVOL sont quantifiés par rapport à la 4-méthyl-2-pentanone utilisée comme standard interne. Les 2,4-alcadiénals et surtout le 2,4-décadiénal, un des composés majeurs des produits d'oxydation volatils des huiles végétales n'ont pas été décelés. Mills (205) a décrit une méthode applicable à des produits contenant des protéines de petit-lait caractéristiques par leurs faibles concentrations en PSVOL dans l'espace de tête. Les PSVOL sont extraits à env. 30° C par entraînement à l'aide d'un flux d'azote d'env. 30 ml / min. La désorption est effectuée à la température de 200° C durant 10 min et les PSVOL sont cryoconcentrés en tête de colonne par immersion de 5 cm de colonne dans de la neige carbonique avant l'injection. Cet auteur a comparé 3 différents adsorbants (Tenax GC, Porapak Q et Chromosorb 105) à différents flux d'azote, températures et durées d'extraction. Selon ces auteurs, le Chromosorb 105 a les meilleures caractéristiques d'adsorption. Le Tenax GC est par contre insatisfaisant pour l'étude des produits fermentés car les composés à bas point d'ébullition comme l'acétaldéhyde, l'éthanol, l'acétone et le diacétyl n'y sont pas retenus. Quant au Porapak Q, il est meilleur que le Tenax mais la désorption provoque la formation de composés interférents. Snyder et al. (190) proposent également une extraction des PSVOL d'huiles de soja avec le système *Tekmar*. L'huile est chauffée à 180° C et le piègeage est effectué sur du Tenax GC durant 15 min. Durant la désorption à 220° C, l'injecteur est en mode splitless et la température du four du GC est maintenue à -65° C. Leland et al. (206) ont analysé des laits avec le système «purge and trap» de *Hewlett Packard*. Le lait est maintenu à 40° C et les PSVOL sont déplacés à l'aide d'un flux d'hélium de 150 ml / min durant 10 min et piégés sur du Tenax GC. La désorption thermique à 180° C dure 3 min durant lesquelles la température du four du GC est maintenue à -45° C. Ces auteurs ont trouvé une corrélation significa-

tive entre les teneurs en divers PSVOL et les données sensorielles et ont pu classer les laits en 4 groupes d'intensités de saveurs d'oxydation sur la base d'informations combinées provenant de 7 PSVOL. Badings et de Jong (209) présentent un système appliqué au lait. Les composés volatils du lait (antimoussant: 1-tétradécanol) maintenu à 30° C sont extrait par un flux d'hélium de 9 ml / min durant 20 min. L'excès d'eau est piégé dans une première trappe refroidie à -10° C et les composés volatils dans un tube capillaire refroidi à l'azote liquide. La désorption est effectuée à env. 250° C. Ces auteurs ont déterminé les saveurs de laits détériorés par chauffage, exposition à la lumière etc. à l'aide de détecteurs à ionisation et à photométrie de flamme. Hall et al. (41) et Hall et Lingnert (207) ont mesuré les composés volatils de l'espace de tête de poudres de lait et de crème reconstituées selon la technique d'échantillonnage utilisée par Murray (208). Les PSVOL d'une suspension aqueuse de poudres de lait ou de crème maintenue à une température se situant entre 25-35° C sont piégés sur du Chromosob 105 ou 102, désorbés à 140° C et cryoconcentrés avant l'injection. Ces auteurs ont établi des équations pour évaluer la stabilité à l'oxydation. Ils déterminent les constantes de vitesse de formation des PSVOL dans des conditions d'oxydation accélérées, ce qui permet de calculer leurs énergies d'activation et d'estimer ainsi l'influence sur l'oxydation de modifications de certains paramètres (p. ex. de la température) d'un procédé technologique. Hall et Lingnert (207) ont également établi des équations pour la prédiction des saveurs de carton (card-

board like). Les PSVOL les plus spécifiques pour ce défaut semblent être le butanal et l'heptanal. Pour le dosage de l'éthane et du pentane, Pitkänen et al. (51) ont mis au point une méthode qu'ils ont appliqué aux tissus biologiques. Les alcanes de l'espace de tête sont adsorbés sur une colonne refroidie de Porasil, désorbés à 120° C et cryoconcentrés sur une portion de la colonne capillaire de séparation avant l'injection. Cette méthode permet un dosage de ces composés dans le domaine des picomoles (≥ 1 pmole). Certains auteurs (41, 207) emploient les techniques SHS + DHS pour déterminer les PSVOL les plus (SHS) et les moins volatils (DHS). Le tableau 6 présente deux exemples de tels dosages.

Autres méthodes

Les indices d'anisidine et de peroxydes sont souvent utilisés conjointement pour calculer la valeur totox (Valeur totox = 2 * indice de peroxyde + 1 * valeur d'anisidine). Selon Holm et Ekblom (130), lorsqu'une huile est chauffée à 200° C sous vide, la décomposition des peroxydes correspondant à une unité de l'indice de peroxyde provoque une augmentation de 2 unités de la valeur d'anisidine. La valeur totox permet de donner une indication sur le passé de l'huile (teneur en aldéhydes) et sur son présent (peroxydes récemment formés). Dans les huiles, cette valeur devrait être inférieure à 10 et peut diminuer de moitié durant le blanchiment et la désodorisation. Elle peut donc constituer l'indication d'un raffinage. D'autres méthodes de dosage des produits d'oxydation sont encore signalées dans la littérature (2, 29). Elles incluent

des techniques d'extraction avec du gaz carbonique à l'état supercritique. Lorsque la pression est relâchée, les produits d'oxydation peuvent par exemple être adsorbés et désorbés selon les techniques utilisées pour les dosages des constituants de l'espace de tête. On utilise également des techniques de *distillation et d'extraction simultanées* (simultaneous distillation extraction: SDE). Ces procédures comportent typiquement une distillation en milieu aqueux et une extraction simultanée des produits volatils à l'aide de solvants. Ces opérations sont en général suivies d'un séchage et d'une concentration des composés volatils de l'extrait organique. Selon Prior et Löliger (29), les techniques SDE sont plus répandues dans le domaine des saveurs en général que dans celui plus spécifique de l'oxydation. Comparées aux techniques SHS et DHS, les techniques SDE permettent de doser des composés volatils à plus hauts points d'ébullition. Toutefois, on a constaté des pertes des composés les plus volatils durant l'étape de concentration. Les diverses techniques de dosages des saveurs volatils seront traitées de manière plus exhaustive dans un article de revue qui paraîtra prochainement (210).

Détermination de la stabilité à l'oxydation

La stabilité à l'oxydation détermine la résistance à l'autooxydation et permet par conséquent de faire des prévisions sur la durée de conservation (shelf life) des lipides. Rossell (28) a récemment passé en revue les différents tests utilisés à ce

Tableau 5 Méthodes de dosage des composés volatils mesurés par «Dynamic Headspace Gaschromatography» (DHS-GC)

Produits analysés	Conditions de l'essai	Colonnes de séparation	Composés principaux déterminés	Références
Huile de soja	Développement de méthode Huiles oxydées à différents degrés	Durabond 5	Acroléine, pentène, pentane, 1-pentène-3-ol, pentanal, hexanal, 2-hexenal, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,4-décadienal	Selke et Frankel (203)
Tissus biologique	Développement de méthode	Al ₂ O ₃ / KCL	Ethane, pentane	Pitkänen et al. (51)
Produits nutritionnels à base de lait	Développement de méthode	DB-5	Pentane, pentanal, 1-pentanol, hexanal, heptanal, t-2-heptenal, octanal, nonanal, décanal	Park et Goins (204)
Concentré de protéines de petit lait	Développement de méthode	SGE (diméthylsilicone)	Diacétyl, 3-méthylbutanal, 2-pentanone, pentanal, toluène, hexanal, octane, 2-heptanone, heptanal, benzaldéhyde	Mills (205)
Lait	Laits détériorés par la lumière, entreposage etc..	OV-1 / carbowax 20 M (1 + 1)	Acétaldéhyde, 2-méthylbutanal, 3-méthylbutanal, acétone, hydrogène sulfuré, sulfure de méthyle, sulfure de diméthyle, disulfure de diméthyle	Badings et de Jong (209)

propos. On distingue principalement les tests de *Schaal*, de *Swift* et de *Sylvester*. Le test de *Schaal* implique un chauffage à l'air de 50-100 g de lipides placés dans des capsules ouvertes à une température donnée (50-105° C suivant les procédures) jusqu'à l'apparition des saveurs d'oxydation qui sont déterminées à intervalles réguliers par voies analytique (Indice de peroxyde (IP), test à l'acide thio-barbiturique (TATB), etc.) et sensorielle. Les résultats analytiques sont habituellement présentés graphiquement en fonction de la durée d'oxydation dans le but de déterminer la période d'induction. Santner et al. (211, 212) ont développé une méthode applicable aux poudres de lait. La graisse libre est extraite à l'aide de solvants et oxydée durant 3 jours à la température de 60° C et l'état d'oxydation est déterminé par le TATB. Selon Pardun et Kroll (213), le test de *Schaal* donne des résultats plus rapidement (en 2-3 jours) qu'avec les autres méthodes et est approprié à la caractérisation de la qualité des lipides et à l'étude des antioxydants. Pour obtenir des résultats répétables, on doit cependant éviter autant que possible des contaminations par des métaux lourds ou d'autres produits provenant par exemple du matériel de laboratoire.

Le test de *Swift* fait partie des méthodes par courant d'air forcé appelées « active oxygen methods (AOM) ». On effectue un

barbotage d'air forcé à travers l'échantillon maintenu à une température de 98° C. Les résultats de l'indice de peroxyde sont, comme avec les autres méthodes, reportés graphiquement en fonction de la durée d'oxydation accélérée. Cette méthode est hautement empirique et il est par conséquent impératif de suivre strictement la procédure si on veut obtenir des résultats répétables. La méthode adaptée par Hadorn et Zürcher (214) a été automatisée par *Metrohm, Herisau*. L'appareil est commercialisé sous le nom de *Rancimat*. Le courant d'air conduit à travers l'échantillon chauffé entre 100-140° C entraîne les substances volatiles (essentiellement de l'acide formique(215)) qui sont piégées dans de l'eau distillée. Celle-ci représente la conductivité de la solution aqueuse entre 2 électrodes de platine. On mesure donc essentiellement les produits d'oxydation secondaires formés après l'oxydation et les résultats analytiques sont en général supérieurs à ceux obtenues avec l'*oxydograph*. Par contre, les résultats obtenus en présence d'antioxydants volatils sont plus faibles en raison de leur entraînement hors des lipides par le courant d'air aux températures appliquées. Cette méthode n'est donc pas applicable à l'étude des antioxydants volatils. Cet appareil est largement utilisé dans l'industrie des huiles végétales en Europe et les périodes

d'induction ainsi déterminées font habituellement partie des critères de qualité (28). Un appareil fonctionnant selon le même principe, appelé OSI (*Oil stability index*), est commercialisé aux USA par *Omnion, Massachusetts*. On mesure le maximum de la deuxième dérivée de la conductivité en fonction du temps et pour normaliser les résultats, il est recommandé de les rapporter à la température de 110° C.

Le test de *Sylvester* implique un chauffage à 100° C sous agitation continue des lipides placés dans un récipient fermé. On mesure la réduction de pression interne provoquée par la consommation d'oxygène. Ce test a été automatisé par la compagnie *Astell* sous la conduite de l'institut de recherches *Leatherhead Food Research Association* et l'appareil est connu sous le nom de *FIRA-Astell*. Cet appareil permet d'éliminer les effets dus aux variations de la pression atmosphérique et de thermostatiser les échantillons entre 50 et 150° C. Les diagrammes du logarithme de la valeur réciproque de l'indice de peroxyde en fonction de la valeur réciproque de la température absolue donnent toujours des corrélations linéaires qui permettent de séparer certaines huiles et graisses selon leurs énergies d'activation. Cet appareil n'est plus en vente mais la compagnie danoise *Mikrolab Aarhus Compagny of Højbjerg* commercialise actuellement

Tableau 6 Méthodes de dosage des composés volatils mesurés sur phase stationnaire OV 101 par « Static Headspace Gaschromatography » (SHS-GC) et « Dynamic Headspace Gaschromatography » (DHS-GC)

Produits analysés	Composés déterminés	Références
Poudre de lait entreposée et reconstituée	Ethanal ¹⁾ , propanal ¹⁾ , n-butanal ¹⁾ , n-hexanal ¹⁾ , n-heptanal ¹⁾ , n-octanal, n-nonanal ¹⁾ , n-décanal, 2-méthylpropanal ¹⁾ , 2-méthylbutanal ¹⁾ , 3-méthylbutanal ¹⁾ , 2-buténal, méthylpropénal 2-propanone ¹⁾ , 2-butanone ¹⁾ , 2-pentanone ¹⁾ , 2-hexanone, 2-heptanone ¹⁾ , 2-octanone, 2-nonanone, 2-undécaneone, 3-méthyle-2-butanone, 3-butène-2-one, 3-octène-2-one, 2,3-butanedione Furane, 2-méthylfuranne ¹⁾ , 2-éthylfuranne ¹⁾ , 2-n-pentylfuranne, 2,5-diméthylfuranne Méthylmercaptane, sulfure de diméthyle ¹⁾ , disulfure de diméthyle ¹⁾ , trisulfure de diméthyle, sulfure de carbonyle, disulfure de carbone ¹⁾ Propane, n-butane ¹⁾ , n-pentane ¹⁾ , n-hexane, n-heptane, n-octane, méthylpropane Isomères du butène ¹⁾ , du pentène, de l'hexène et du pentadiène Ethanol, méthylacétate, benzène, toluène	Hall et al. (41)
Poudre de crème entreposée et reconstituée	Ethanal, propanal, n-butanal, n-pentanal, n-hexanal, n-heptanal, n-octanal, n-nonanal, 2-méthylpropanal, 2-méthyl-2-propénal, 2-méthylbutanal, 3-méthylbutanal 2-propanone, 2-butanone, 2-pentanone, 2-hexanone, 2-heptanone, 2-octanone, 2-nonanone, 2-undécaneone, 2,3-butanedione, 2,3-pentanedione, 3-butène-2-one Furanne, 2-méthylfuranne, 2-éthylfuranne, 2,5-diméthylfuranne Sulfure de diméthyle, disulfure de diméthyle, trisulfure de diméthyle, disulfure de carbone Propane, n-butane, n-pentane, n-hexane, n-heptane, n-octane Isomères du butène, du pentène, de l'hexène Ethanol, méthylacétate, éthylacétate	Hall et Lingnert (207)

¹⁾ Composés pour lesquels les coefficients de variation selon Pearson (concentration en fonction de la durée d'entreposage des poudres de lait) sont ≥ 0.6

l'oxydograph qui fonctionne selon le même principe. Cette méthode est aussi applicable à l'étude de l'influence des antioxydants volatils sur la stabilité à l'oxydation des lipides.

Conclusions

Il existe de nombreuses méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides. Certaines méthodes ne sont applicables qu'à la détermination de l'état d'oxydation d'un produit à un moment donné et d'autres sont en plus appropriées à l'étude de la détérioration oxydative. Les méthodes à appliquer doivent souvent être choisies non seulement en fonction des buts des essais à entreprendre mais aussi selon les sortes, les qualités et les compositions des produits à analyser.

Pour le dosage des substrats, les mesures de consommation d'oxygène durant l'oxydation constituent des méthodes de routine employées dans pratiquement tous les laboratoires spécialisés dans la chimie des lipides.

Pour le dosage des composés primaires, on mesure le plus souvent l'indice de peroxyde qui constitue un bon indicateur de l'oxydation des lipides, surtout durant la période d'induction de l'auto-oxydation. La détermination des radicaux par résonance paramagnétique électronique est une technique encore peu employée, probablement aussi en raison du prix élevé de l'équipement. Elle permet de détecter un processus d'oxydation plus précocement qu'avec toutes les autres méthodes. Quant aux méthodes spectrophotométriques, le dosage des diènes conjugués donne une indication rapide sur l'étendue de l'oxydation mais il n'est pas suffisamment spécifique en raison de la présence de substances naturelles, constituées de diènes conjugués, dans les lipides non oxydés. Le dosage par chimiluminescence constitue une méthode rapide, qui ne demande aucun prétraitement des échantillons. Cette technique n'est cependant pas encore très répandue en raison de la faible émission de chimiluminescence des produits oxydés et le besoin d'un appareillage sophistiqué. Les mesures de fluorescence permettent par contre de détecter de basses teneurs en peroxydes si on choisit des réactifs fortement fluorescents à l'état oxydé. Quant aux méthodes chromatographiques, les techniques HPLC permettent de déterminer de faibles teneurs en hydroperoxydes. Elles comportent en outre l'avantage de déterminer les isomères géométriques des hydroperoxydes et de séparer des substances interférentes telles que des pigments qui faussent par exemple le dosage de

l'indice de peroxyde. Les méthodes GC sont plus fastidieuses à exécuter en raison de la dérivation nécessaire. Quant aux méthodes polarographiques, elles sont peu utilisées pour le contrôle de qualité des lipides.

Pour le dosage des composés secondaires, les déterminations spectrophotométriques conventionnelles (Tests de Kreis, à l'anisidine, à l'acide thiobarbiturique, indice de carbonyle) sont de plus en plus remplacées par des dosages plus spécifiques des produits d'oxydation. Par contre, les méthodes de mesure de la fluorescence formée durant l'oxydation sont prometteuses en raison de leur bonne sensibilité. Cependant, les structures chimiques des composés fluorescents (bases de Schiff) sont la plupart du temps inconnues et ces composés devraient d'abord être séparés et identifiés. Quant aux méthodes chromatographiques, les techniques sur couche mince permettent de séparer et d'identifier les composés monocarbonylés volatils et non volatils quantitativement dans le domaine du ng mais ces techniques comportent de nombreuses étapes et ne sont donc pas adaptées à la routine. Par contre, les dosages des composés volatils par GC ont pris une importance considérable ces dix dernières années. Ils comportent l'énorme avantage de déterminer les substances les plus spécifiques des saveurs. Quant aux déterminations de la stabilité à l'oxydation, les tests rapides sont communément utilisés dans les laboratoires des lipides. On peut toutefois regretter que les résultats analytiques ne soient pas encore systématiquement normés à une température donnée.

Dédicace et remerciements

Les auteurs dédicacent ce document à *Fabien Mazzotti*, décédé durant la rédaction d'un travail semblable. Ils remercient le *Dr Raoul Daniel* pour ses remarques lors de la rédaction du manuscrit.

Zusammenfassung

M. COLLOMB et MONIKA SPAHNI

Übersicht der Methoden für die Bestimmung von Lipidoxidyationsprodukten, insbesondere von Milchlipiden

Schweiz. Milchw. Forsch. 25 (1) 3 - 24 (1996)

Dieser Übersichtsartikel beschreibt kurz die Mechanismen der Lipidautoxidation und stellt die wichtigsten Oxidationspro-

dukte (Aldehyde, Ketone, Alkohole, Kohlenwasserstoffe) vor, die man in Lipiden von Milchprodukten finden kann. Er befasst sich mit den wichtigsten Methoden für die Bestimmung der primären und sekundären Produkte der Lipidoxidation und mit der Prüfung der Oxidationsstabilität.

Summary

M. COLLOMB et MONIKA SPAHNI

Review of the Methods for the Determination of Lipidoxidation products, with special reference to Milk Lipids

Schweiz. Milchw. Forsch. 25, (1) 3 - 24 (1996)

This work describes briefly the mechanisms of lipid oxidation and lists the most important products (Aldehydes, ketones, alcohols, hydrocarbons) of lipid oxidation in dairy products. The principal methods for measuring the primary and secondary products of lipid oxidation are reviewed as well as tests of resistance to oxidation.

Bibliographie

- 1 Charamboulos, G. (Ed.). *Off Flavors in Foods and Beverages*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V. (1992)
- 2 Schreier, P. (Ed.). *Analysis of Volatiles. Methods. Applications*. Berlin and New York: Walter de Gruyter (1984)
- 3 Charalambous, G. and Inglett, I. *Chemistry of Foods and Beverages: Recent Developments*. London and New York: Academic Press Inc. (1982)
- 4 Spontaneous oxidized flavour in cows' milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, **281**, (1993)
- 5 Allen, J.C. and Hamilton, R.J. (Eds). *Rancidity in Foods*. Glasgow: Blackie Academic and Professional (1994)
- 6 Dumont, J.P. and Adda, J. Flavour formation in dairy products. In: Land, D.G and Nursten, H.E. (Eds), *Progress in Flavour Research. Proceedings of the Second Weurman Flavour Research Symposium, Norwich*. London: Applied Science Publishers Ltd, pp. 245-262 (1978)
- 7 Richardson, T. and Korycka-Dahl, M. Lipid oxidation. In: Fox, P.F. (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry-2*. London and New York: Applied Science Publishers Ltd, pp. 241-363 (1983)
- 8 Spikes, J.D. Photodegradation of

- foods and beverages. In: Smith, K.C. (Ed.), *Photochemical and photobiological reviews*, 6. New York: Plenum, pp. 39-85 (1981)
- 9 Weihrauch, J.L. Lipids of milk. Deterioration. In: Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M. and Marth, E.H. (Eds), *Fundamentals of Dairy Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold Company, pp. 215-278 (1988)
 - 10 Adda, J. Flavour of dairy products. In: Birch, G.G. and Lindley, M.G. (Eds), *Developments in Food Flavours*. London and New York: Elsevier Applied Science, pp. 151-172 (1986)
 - 11 Technical guide for the packaging of milk and milk products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 300, (1995)
 - 12 Cerny, Z. Vergleich zwischen der instrumentellen und sensorischen Analyse des Oxidationsgeschmacks in Butter. Dissertation Nummer 8418, Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich (1987)
 - 13 Nawar, W.W. Lipids. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*. New York and Basel: Marcel Dekker, pp. 139-244 (1985)
 - 14 Frankel, E.N. Review. Recent advances in lipid oxidation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 54, 495-511 (1991)
 - 15 Sattar, A. and deMan, J.M. Photooxidation of milk and milk products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 13-37 (1975)
 - 16 Shipe, W.F., Bassette, R., Deane, D.D., Dunkley, W.L., Hammond, E.G., Harper, W.J., Kleyn, D.H., Morgan, M.E., Nelson, J.H. and Scanlan, R.A. Off flavors of milk: Nomenclature, standards and bibliography. *Journal of Dairy Science*, 61, 855-869 (1978)
 - 17 Badings, H.T. and Neeter, R. Recent advances in the study of aroma compounds of milk and dairy products. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34, 9-30 (1980)
 - 18 Bekbölet, M. Light effects on food. *Journal of Food Protection*, 53, 430-440 (1990)
 - 19 Forss, D.A. The flavors of dairy fats. A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 702-710 (1971)
 - 20 Allen, J.C. and Joseph, G. Deterioration of pasteurized milk on storage. Review article. *Journal of Dairy Research*, 52, 469-487 (1985)
 - 21 Frankel, E.N. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, 19, 1-22 (1980)
 - 22 Maga, J.A. Furans in foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 11, 355-400 (1979)
 - 23 Forss, D. A. Fishy flavor in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 47, 245-250 (1964)
 - 24 Bosset, J.O., Daget, N., Desarzens, C., Dieffenbacher, A., Gauch, R., Tagliaferri, E. and Trisconi, M.J. Effet protecteur de l'emballage contre la photo-oxydation. *Information FAM*, Nummer 183 W, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, 3097 Liebefeld-Bern (1989)
 - 25 Logani, M.K. and Davies, R.E. Lipid oxidation: Biological effects and antioxidants. A review. *Lipids*, 15, 485-495 (1980)
 - 26 Hamilton, R.J. The Chemistry of rancidity in foods. In: Allen, J.C. and Hamilton, R.J. (Eds). *Rancidity in Foods*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, pp. 1-21 (1994)
 - 27 Allen, J.C. Rancidity in dairy products. In: Allen, J.C. and Hamilton, R.J. (Eds). *Rancidity in Foods*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, pp. 179-190 (1994)
 - 28 Rossell, J.B. Measurement of rancidity. In: Allen, J.C. and Hamilton, R.J. (Eds). *Rancidity in Foods*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, pp. 22-53 (1994)
 - 29 Prior, E. and Löliger, J. Spectrophotometric and chromatographic assays. In: Allen, J.C. and Hamilton, R.J. (Eds). *Rancidity in Foods*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, pp. 104-127 (1994)
 - 30 Shipe, W. F. Oxidations in the dark. *Journal of Dairy Science*, 47, 221-230 (1964)
 - 31 Azzara, C.D. and Campbell, L.B. Off-Flavors of Dairy products. In: Charamboulos, G. (Ed.), *Off Flavors in Foods and Beverages*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., pp. 329-374 (1992)
 - 32 Bodyfelt, F.W., Tobias, J. and Trout, G.M. (Eds), *The Sensory Evaluation of Dairy Products*, Ch. 4: Sensory Defects of Dairy Products: An Overview. New York: Van Nostrand Reinhold, pp. 59-106 (1988)
 - 33 St-Laurent, A.M., Hidirolou, M., Snoddon, M. and Nicholson, J.W.G. Effect of α -tocophérol supplementation to dairy cows on milk and plasma α -tocophérol concentrations and on spontaneous oxidized flavors in milk. *Canadian Journal of Animal Science*, 70, 561-570 (1990)
 - 34 Kempanna, C. and Unnikrishnan. Destruction of β -carotene on storage and its correlation to oxidative deterioration of ghee. *Indian Journal of Dairy Science*, 37, 220-224 (1984)
 - 35 Badings, H.T. Cold-storage defects in butter and their relation to the autoxidation of unsaturated fatty acids. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 24, 147- 256 (1970)
 - 36 Emmons, D.B., Froehlich, D.A., Paquette, G.J., Butler, G., Beckett, D.C., Modler, H.W. Brackenridge, P. and Daniels, G. Light transmission characteristics of wrapping materials and oxidation of butter by fluorescent light. *Journal of Dairy Science*, 69, 2248-2267 (1986)
 - 37 Foley, J., Gleeson, J.J. and King, J.J. Influence of pasteurization and homogenization treatments on photocatalyzed oxidation of cream. *Journal of Food Protection*, 40, 25-28 (1977)
 - 38 Foley, J. and King, J.J. Influence of pasteurization before and after separation of cream on the oxidative stability of ripened cream butter. *Journal of Food Protection*, 40, 480-483 (1977)
 - 39 Gray, J.I. Measurements of lipid oxidation. A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 539-546 (1978)
 - 40 Joshi, N.S. and Thakar, P.N. Methods to evaluate deterioration of milkfat. A critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 31, 181-196 (1994)
 - 41 Hall, G., Andersson, J., Lingnert, H. and Olofsson, B. Flavor changes in whole milk powder during storage. II. The kinetics of the formation of volatile fat oxidation products and other volatile compounds. *Journal of Food Quality*, 7, 153-190 (1985)
 - 42 Kinsella, J.E., Patton, S., and Dimick, P. S. The flavor potential of milk fat. A review of its chemical nature and biochemical origin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44, 449-454. (1967)
 - 43 Kinsella, J.E. The flavour chemistry of milk lipids. *Chemistry and Industry*, 2, 36-42 (1969)
 - 44 Stark, W. and Forss, D. A. A compound responsible for metallic flavour in dairy products. I. Isolation and Identification. *Journal of Dairy Research*, 29, 173-180 (1962)
 - 45 Swoboda, P.A.T. and Peers, K.E. Metallic odour caused by vinyl ketones formed in the oxidation of butterfat. The identification of octa-1-cis-5-dien-3-one. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 28, 1019-1024 (1977)
 - 46 Forss, D.A. Mechanism of formation of aroma compounds in milk and other dairy products. Paper 78 ST. XX *International Dairy Congress*, Paris (1978)
 - 47 Chang, S.S., Smouse, T.H., Krishnamurthy, R.G., Mookherjee, B.D. and Reddy, B.R. Isolation and identification of 2-pentyl-furan as contribution to the reversion flavour of soyabean oil. *Chemistry and Industry*, 12, 1926-1927 (1966)
 - 48 Badings, H.T. Aroma compounds from butter with cold-storage oxidation defects and from autoxidized fatty acids. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 24, 61-63 (1970)

- 49 Grosch, W. Neuere Vorstellungen über die Lipidoxidation. *Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie*, **38**, 81-87 (1984)
- 50 Löliger, J. Headspace gas analysis of volatile hydrocarbons as a tool for the determination of the state of oxidation of foods stored in sealed containers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **52**, 119-128 (1990)
- 51 Pitkänen, O.M., Hallman, M. and Andersson, S.M. Determination of ethane and pentane in free oxygen radical-involved lipid peroxidation. *Lipids*, **24**, 157-159 (1989)
- 52 Swoboda, P.A.T. and Peers, K.E. Volatile compounds responsible for metallic, fishy taint formed in butterfat by selective oxidation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **28**, 1010-1018 (1977)
- 53 Methoden für die Untersuchung und Beurteilung von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen. Kapitel 6: Butter, Tabelle 6.2. In: Bundesamt für Gesundheitswesen (Ed.), *Schweizerisches Lebensmittelbuch*. Bern: Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, p. 5 (1973)
- 54 Farr, D.R., Löliger, J. and Savoy, M.C. Foods protected by the important biological antioxidant: Uric acid. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **37**, 804-810 (1986)
- 55 Burri, J., Graf, M., Lambelet, P. and Löliger, J. Vanillin: more than a flavouring agent - a potent antioxidant. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **48**, 49-56 (1989)
- 56 Stark, W., Urbach, G. and Hamilton, J. Volatiles compounds in butter oil. IV. Quantitative estimation of free fatty acids and free δ -lactones in butter oil by cold-finger distillation. *Journal of Dairy Research*, **43**, 469-477 (1976)
- 57 Collomb, M. and Spahni, M. Revue des méthodes de dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **28**, 355-379 (1995)
- 58 Bosset, J.O., Collomb, M., Spahni-Rey, M. and Gauch, R. L'analyse des gaz entourant les aliments préemballés: revue des méthodes actuelles et mise au point d'un nouveau, chromatographe gaz/solide à détection catharométrique. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **80**, 430-451 (1989)
- 59 Rerkrai, S., Jeon, I.J. and Bassette, R. Effect of various direct ultra-high temperature heat treatments on flavor of commercially prepared milks. *Journal of Dairy Science*, **70**, 2046-2054 (1987)
- 60 Sidhu, G.S., Brown, M.A. and Johnson, A.R. Autoxidation in milk rich in linoleic acid. *Journal of Dairy Research*, **42**, 185-195 (1975)
- 61 Wadworth, K.D. and Bassette, R. Effect of oxygen on development of off-flavors in ultrahigh-temperature milk. *Journal of Food Protection*, **48**, 487-493 (1985)
- 62 Miyamoto, T., Nakae, T. and Nakazawa, Y. Oxidation of double bonds in unsaturated fatty acids of butterfat. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **22**, 107-111 (1989)
- 63 Cité par Lambelet et Löliger (65). Yamamoto, Y., Hasegawa, H. and Iizuka, A. Patent application no. 106'665/79 (1979)
- 64 Bascetta, E., Gunstone, F.D. and Walton, J.C. Electron spin resonance study of the role of vitamin E and vitamin C in the inhibition of fatty acid oxidation in a model membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*, **33**, 207-210 (1983)
- 65 Lambelet, P. and Löliger, J. The fate of antioxidant radicals during lipid autooxidation. I. The tocopheroxyl radicals. *Chemistry and Physics of Lipids*, **35**, 185-198 (1984)
- 66 Prior, E. and Lambelet, P. Article probablement publié dans Special Issue of the *Journal of Magnetic Resonance Analysis* (1996)
- 67 Pont, E.G. A deemulsification technique for use in peroxide test on the fat of milk, cream, concentrated and dried milks. *Australian Journal of Dairy Technology*, **10**, 72-74 (1955)
- 68 Newstead, D.F. and Headifen, J.M. A reappraisal of the method for estimation of the peroxide value of fat in whole milk powder. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **15**, 13-18 (1981)
- 69 Stine, C.M., Harland, H.A., Coulter, S.T. and Jenness, R. A modified peroxide test for detection of lipid oxidation in dairy products. *Journal of Dairy Science*, **37**, 202-208 (1954)
- 70 Smith, J.A.B. The rapid determination of peroxide value for the fat in milk powder. *Journal of Dairy Research*, **10**, 294-299 (1939)
- 71 Downey, W.K. Lipid oxidation as a source of off-flavour development during the storage of dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **22**, 154-156 (1969)
- 72 Lea, C.H. The effect of light on the oxidation of fats. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **108**, 175-189 (1931)
- 73 Wheeler, D.H. Peroxide formation as a measure of autoxidative deterioration. *Oil and Soap*, **9**, 89-97 (1932)
- 74 Peroxide value of oils and fats. Method 965.33. In: Helrich, K. (Ed.), *AOAC Official Methods of Analysis*, 15th Edition. Arlington: AOAC, pp. 956-957 (1990)
- 75 Method Cd 8-53. *Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society*. Walker, R.O. (Ed.), Champaign. (1992)
- 76 Timmen, H. Bestimmung der Peroxidzahl und Prüfung der Oxydationsstabilität von Butterfett. *Milchwissenschaft*, **30**, 329-331 (1975)
- 77 Sully, B.D. A modified iodometric determination of organic peroxides. *Analyst*, **79**, 86-90 (1954)
- 78 Peroxidzahl. Einheitsmethoden C VI 6a. In: Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Abteilung C: Fette. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (Ed.), *DGF-Einheitsmethoden*. Stuttgart: Wissenschaftliches Verlagsgesellschaft mbH, (1984)
- 79 Swoboda, P.A.T., Lea, C.H. Determination of the peroxide value of edible fats by colorimetric iodometric procedures. *Chemistry and Industry*, **16**, 1090-1091 (1958)
- 80 Fiedler, U. A coulometric method for the determination of low peroxide values of fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **51**, 101-103 (1974)
- 81 Hara, S., Totani, Y. A highly sensitive method for the micro-determination of lipid hydroperoxides by potentiometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **65**, 1948-1950 (1988)
- 82 Chapman, R., McFarlane, W. A colorimetric method for the determination of fat peroxides and its application in the study of keeping quality of milk powders. *Canadian Journal of Research*, **21B**, 133-139 (1943)
- 83 Lips, A., Chapman, R.A., McFarlane, W.D. The application of the ferric thiocyanate method to the determination of incipient rancidity in fats and oils. *Oil and Soap*, **20**, 240-243 (1943)
- 84 Hills, G.L. and Thiel C.C. The ferric thiocyanate method of estimating peroxide in the fat of butter, milk and dried milk. *Journal of Dairy Research*, **14**, 340-353 (1946)
- 85 Holloway, G.L. Notes on the ferric thiocyanate peroxide test. *Australian Journal of Dairy Technology*, **21**, 74-76 (1966)
- 86 FIL-IDF. Matière grasse déshydratée. Détermination de l'indice de peroxyde. Norme provisoire, **74 A**, (1991)
- 87 Hamm, D.L., Hammond, E.G., Parvanah, V. and Snyder, H. The determination of peroxides by the Stamm method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **42**, 920-922 (1965)
- 88 Hamm, D.L. and Hammond, E.G. Comparison of modified stumm,

- iron and iodometric peroxide determination on milk fat. *Journal of Dairy Science*, **50**, 1166-1168 (1967)
- 89 Farmer, E.H. and Sutton, D.A. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes. Part V. *Journal of the Chemical Society*, 119-124, (1943)
 - 90 Privett, O.S. and Blank, M.L. The initial stages of autoxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **39**, 465-469 (1962)
 - 91 St Angelo, A.J., Ory, R.L. and Brown, L.E. Comparison of methods for determining peroxidation in processed whole peanut products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **52**, 34-35 (1975)
 - 92 Yanishlieva, N. and Popov, A. La spectrophotométrie ultraviolette en tant que méthode d'estimation de l'état d'oxydation des lipides insaturés. *Revue française des corps gras*, **1**, 11-26 (1973)
 - 93 Brown, H.G. and Snyder, H.E. Conjugated dienes of crude soy oil. Detection by UV spectrophotometry and separation by HPLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **59**, 280-283 (1982)
 - 94 Cité par Joshi et Thakar (40). Atramentova, V.G. Determination of the oxidation time of milk fat. *USSR Patent*, **567**, 134 (1977)
 - 95 Parr, L.J. and Swoboda, P.A.T. The assay of conjugable oxidation products applied to lipid deterioration in stored foods. *Journal of Food Technology*, **11**, 1-12 (1976)
 - 96 Cité par Gray (39). Holman, R.T. and Burr, G.O. *Journal of the American Chemical Society*, **68**, 562 (1946)
 - 97 Akasaka, K., Sasaki, I., Ohuri, H. and Meguro, H. A simple fluorometry of hydroperoxides in Oils and Foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **56**, 605-607 (1992)
 - 98 Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Tomás, V. and Val, O. Fluorometric flow-injection determination of hydroperoxides in foodstuffs. *Food Chemistry*, **46**, 301-305 (1993)
 - 99 Boveris, A., Cadenas, E. and Chance, B. Ultraweak chemiluminescence. A sensitive assay for oxidative radical reactions. *Federation Proceedings*, **40**, 195-198 (1981)
 - 100 Vassil'ev, R.F. Chemiluminescence in liquid -phase reactions. *Progress in Reaction Kinetics*, **4**, 305-352 (1967)
 - 101 Cité par Joshi et Thakar (40). Klebanov, G.I., Aristova, V.P. and Tostukhima, L.S. CL methods for study of fat peroxidation. *Mol promysh*, **42**, 48-55 (1976)
 - 102 Usuki, R., Kaneda, T., Yamagishi, A., Takyu, C. and Inaba, H. Estimation of oxidative deterioration of oils and foods by measurement of ultraweak chemiluminescence. *Journal of Food Science*, **44**, 1573-1576 (1979)
 - 103 Miyazawa, T., Kikuchi, M., Fujimoto, K., Endo, Y., Cho, S.Y., Usuki, R. and Kaneda, T. Shelf-life dating of fish meats in terms of oxidative rancidity as measured by chemiluminescence. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **68**, 39-43 (1991)
 - 104 Timms, R.E., Roupas, P. and Rogers, W.P. Determination of oxidative deterioration of milk powder and reconstituted milk by measurement of chemiluminescence. *Journal of Dairy Research*, **49**, 645-654 (1982)
 - 105 Timms, R.E. and Roupas, P. The application of chemiluminescence to the study of oxidation of oils and fats. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **15**, 372-377 (1982)
 - 106 Miyazawa, T., Yasuda, K. and Fujimoto, K. Chemiluminescence-High performance liquid chromatography of phosphatidylcholine hydroperoxide. *Analytical Letters*, **20**, 915-925 (1987)
 - 107 Robards, K., Kerr, A.F. and Patsalides, E. Rancidity and its measurement in edible oils and snack foods. *Analyst*, **113**, 213-224 (1988)
 - 108 Cité par Prior and Löliger (29). Song, J.H., Chang, C.O. and Park, D.K. *Korean Biochemistry Journal*, **25**, 337 (1992)
 - 109 Akasaka, K., Ijichi, S., Watanabe, K., Ohuri, H., and Meguro, H. High performance liquid chromatography and post-column derivatization with diphenyl-1-pyrenylphosphine for fluorimetric determination of triacylglycerol hydroperoxides. *Journal of Chromatography*, **596**, 197-202 (1992)
 - 110 van Kuijk, F.J.G.M., Thomas, D.W., Stephens, R.J. and Dratz, E.A. Gaschromatography-mass spectrometry method for determination of phospholipid peroxides. II. Transesterification to form pentafluorobenzyl esters and detection with picogram sensitivity. *Journal of Free Radicals in Biologie and Medicine*, **1**, 387-393 (1983)
 - 111 Jarvi, P.K., Lee, G.D., Erickson, D.R. and Butkus, E.A. Determination of rancidity of soybean oil by gaschromatography compared with peroxide value. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **48**, 121-124 (1971)
 - 112 Bortolomeazzi, R., Pizzale, L. and Lecker, G. Chromatographic determination of position and configuration isomers of methyl-oleate hydroxides from corresponding hydroperoxides. *Chromatographia*, **36**, 61-64 (1993)
 - 113 van Zoeren-Grobbe, D., Moison, R.M.W., Ester, W.M., and Berger, H.M. Lipid peroxidation in human milk and infant formula. Effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatrica*, **82**, 645-649 (1993)
 - 114 Lewis, W.R., Quackenbush, F.W. and de Vries, T. Polarographic studies of organic peroxides in non aqueous solutions. *Analytical Chemistry*, **21**, 762-765 (1949)
 - 115 Ricciuti, C., Coleman, J.E. and Willits, C.O. Statistical comparison of three methods for determining organic peroxides. *Analytical Chemistry*, **27**, 405-407 (1955)
 - 116 Cité par Gray (39). Method Cd 9-57. *Official and tentative Methods of the American Oil Chemists' Society*, Vol 1, third Edition, Champaign (1971)
 - 117 Holt, K.E., Greenspan, F.P., Lundberg, W.O., Schroeder, W.D., Swern, D. and Wallace, J.G. Report of the fat analysis committee, subcommittee on oxirane oxygen, 1956. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **34**, 476-477 (1957)
 - 118 Fioriti, J.A., Bentz, A.P. and Sims, R.J. The reaction of picric acid with epoxides. I. A colorimetric method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **43**, 37-41 (1966)
 - 119 Fioriti, J.A., Bentz, A.P. and Sims, R.J. The reaction of picric acid with epoxides. II. The detection of epoxides in heated oils *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **43**, 487-490 (1966)
 - 120 Ulberth, F. and Rubicek, D. Evaluation of a static headspace gas chromatographic method for the determination of lipid peroxides. *Food Chemistry*, **46**, 137-141 (1993)
 - 121 O'Connor, R.J. Application of infrared spectrophotometry to fatty acid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **33**, 1-15 (1956)
 - 122 Henick, A.S. Detection of deterioration products of autoxidizing milk fat by infrared spectrophotometry. *Food Technology*, **5**, 145-147 (1951)
 - 123 Arya, S.S., Ramanujam, S. and Vijayaraghavan, P.K. Refractive index as an objective method for evaluation of rancidity in edible oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **46**, 28-30 (1969)
 - 124 Kreis, H. Ueber neue Farbenreaktionen fetter Oele. *Chemiker Zeitung*, **26**, 897 (1902)
 - 125 Patton, S., Keeney, M. and Kurtz, G.W. Compounds producing the Kreis color reaction with particular reference to oxidized milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **36**, 61-64 (1959)

- mists' Society, **28**, 391-393 (1951)
- 126 Cité par Rossell (28). Kreis test, British Standard 684, Section 2.32 (1985)
 - 127 Brown, W.C. and Thurston, L.M. A review of oxidation of milk and milkproducts as related to flavour. *Journal of Dairy Science*, **23**, 629-685 (1940)
 - 128 Holm, U., Ekbom, K. and Wode, G. Determination of extent of oxidation of fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **34**, 606-609 (1957)
 - 129 List, G.R., Evans, C.D., Kwolek, W.F., Warner, K., and Boundy, B.K. Oxidation and quality of soybean oil. A preliminary study of the anisidine test. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **51**, 17-21 (1974)
 - 130 Cité par Rossell. Holm, U. and Ekbom, K. *Proceedings, International Society for Fat Research Congress*, Gothenburg, Sweden (1972)
 - 131 Cité par Rossell (28). Method 2.504. *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* (1987)
 - 132 Measurement of Rancidity. In: Kirk, R.S. and Sawyer, R. (Eds), *Pearson's Composition and Analysis of Foods, ninth edition*. Harlow, Essex, UK: Longman Scientific and Technical, pp.639-644 (1991)
 - 133 Sattar, A., deMan, J. and Alexander, J.C. Light induced oxidation of edible oils and fats. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **9**, 149-152 (1976)
 - 134 Kohn, H. I. and Liversedge, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, epinephrine and menadione. *Journal of Pharmacology*, **82**, 292-297 (1944)
 - 135 Bernheim, F.M., Bernheim, L.C. and Wilbur, K.M. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *Journal of Biological Chemistry*, **174**, 257-264 (1948)
 - 136 Sinnhuber, R.O., Yu, T.C., and Chang, Y.T. Characterisation of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Research*, **23**, 626-634 (1958)
 - 137 Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T. and Dugan, L.Jr. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **37**, 44-48 (1960)
 - 138 Tarladgis, B.G., Pearson, A.M. and Dugan, L.Jr. The chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for the determination of oxidative rancidity in foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **39**, 34-39 (1962)
 - 139 Dahle, L.K., Hill, E.G., Holman, R.T. The thiobarbituric reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methylesters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **98**, 253-261 (1962)
 - 140 Patton, S. and Kurtz, G.W. 2-thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *Journal of Dairy Science*, **34**, 669-674 (1951)
 - 141 Patton, S. and Kurtz, G.W. A note on the thiobarbituric acid test for milk lipid oxidation. *Journal of Dairy Science*, **38**, 901 (1955)
 - 142 Kosugi, H., Kato, T. and Kikugawa, K. Formation of red pigment by a two-step 2-thiobarbituric acid reaction of alka-2,4-dienals. Potential products of lipid oxidation. *Lipids*, **23**, 1024-1031 (1988)
 - 143 Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Poli, G. and Slater, T.F. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, **208**, 129-140 (1982)
 - 144 Yu, L.W., Latriano, L., Duncan, S., Hartwick, R.A. et Witz, G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans, trans-muconaldehyde. *Analytical Biochemistry*, **156**, 326-333 (1986)
 - 145 Hoyland, D.V. and Taylor, A.J. A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chemistry*, **40**, 271-291 (1991)
 - 146 Ward, D.D. The TBA assay and lipid oxidation. An overview of the relevant literature. *Milchwissenschaft*, **40** (10), 583-588 (1985)
 - 147 Biggs, D.A. and Bryant, L.R. The thiobarbituric acid test for butterfat oxidation. *Canadian Journal of Technology*, **31**, 138-145 (1953)
 - 148 Pokorny, J., Valentova, H., David, J. Modified determination of 2-thiobarbituric acid value in fats and oils. *Nahrung*, **29**, 31-38 (1985)
 - 149 Dunkley, W.L. and Jennings, W.G. A procedure for application of the thiobarbituric acid test to milk. *Journal of Dairy Science*, **34**, 1064-1069 (1951)
 - 150 Hoyland, D.V. and Taylor, A.J. A modified distillation method for the detection of fat oxidation in foods. *International Journal of Food Science and Technology*, **24**, 153-161 (1989)
 - 151 Younathan, M.T. and Watts, B.M. Oxidation of tissue lipids in cooked pork. *Food Research*, **25**, 538-543 (1960)
 - 152 Pikul, J., Leszczynski, D.E. and Kummerow, F.A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 1309-1313 (1989)
 - 153 Sidwell, C.H., Harold, S., Benca, M. and Mitchell, J.H. The use of TBA as a measure of fat oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1**, 603-606 (1954)
 - 154 King, R.L. Oxidation of milk fat globule membrane material. I. Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. *Journal of Dairy Science*, **45**, 1165-1171 (1962)
 - 155 McDowell, A.K.R. The effect of salt and antioxidants on the keeping quality of butter. *Journal of Dairy Research*, **22**, 349-364 (1955)
 - 156 Dunkley, W. L. and Franke, A. A. Evaluating susceptibility of milk to oxidized flavor. *Journal of Dairy Science*, **50**, 1-9 (1967)
 - 157 Bird, R.P., Hung, S.S.O., Hardley, M. and Draper, H.H. Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, **128**, 240-244 (1983)
 - 158 Kakuda, Y., Stanley, D.W. and Van de Voort, F.R. Determination of TBA number by high performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **58**, 773-775 (1981)
 - 159 Kosugi, H. and Kikugawa, K. Reaction of thiobarbituric acid with saturated aldehydes. *Lipids*, **21**, 537-542 (1986)
 - 160 Marcuse, R., Johansson, L. Studies on the TBA test for rancidity grading. II. TBA reactivity of different aldehyde classes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **50**, 387-391 (1973)
 - 161 Butkus, H., Rose, R.J. Amine malonaldehyde condensation products and their relative color contribution in the thiobarbituric acid test. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **49**, 440-443 (1972)
 - 162 Lillard, D.A. and Day, E.A. Autoxidation of milk lipids. II. The relationship of sensory to chemical methods for measuring the oxidized flavour of milk fats. *Journal of Dairy Science*, **44**, 623-632 (1961)
 - 163 Hegenauer, J., Saltman, P., Ludwig, D., Ripley, L. and Bajo, P. Effects of supplemental iron and copper on lipid oxidation in milk. 1. Comparison of metal complexes in emulsified and homogenized milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27**, 860-867 (1979)
 - 164 Henick, A.S., Benca, M.F. and Mitchell Jr, J.H. Estimating carbonyl compounds in rancid fats and foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **31**, 88-91 (1954)
 - 165 Mizuno, G.R. and Chipault, J.R. Interference of peroxides with the determination of total carbonyls in

- autooxidized fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **42**, 839-841 (1965)
- 166 Fioriti, J. Reduction of hydroperoxide interference in the 2,4-DNP determination of carbonyls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **42**, 743-744 (1965)
 - 167 Day, E.A., Bassette, R. and Keeney, M. Identification of volatile carbonyl compounds from cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **43**, 463-474 (1960)
 - 168 Frankel, E.N., Neff, W.E. and Selke, E. Analysis of autooxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autooxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids*, **16**, 279-285 (1981)
 - 169 Gaddis, A.M., Ellis, R., Currie, G.T. and Thornton, F.E. Carbonyls in oxidizing fat. X. Quantitative differences in individual aldehydes isolated from autooxidized lard by mild methods of extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **43**, 242-244 (1966)
 - 170 Lea, C.H. and Swoboda, P.A.T. A simple vacuum distillation procedure for determination of volatile carbonyl content of autooxidizing edible fats. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **13**, 148-158 (1962)
 - 171 Chiba, T., Takazawa, M. and Fujimoto, K. A simple method for estimating carbonyl content in peroxide-containing oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **66**, 1588-1592 (1989)
 - 172 Dillard, C.J. and Tappel, A.L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes. *Lipids*, **6**, 715-721 (1971)
 - 173 Bidlack, W.R. and Tappel, A.L. Fluorescent products of phospholipids during peroxidation. *Lipids*, **8**, 203-207 (1973)
 - 174 Buttkus, H. and Rose, R.J. Amine-Malonialdehyde condensation products and their relative color contribution in the thiobarbituric acid test. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **49**, 440-443 (1972)
 - 175 Trombly, R. and Tappel, A.L. Fractionation and analysis of fluorescent products of lipid peroxidation. *Lipids*, **10**, 441-447 (1975)
 - 176 Hitchcock, C. and Hammond, E.W. The determination of lipids in foods. In: King, R.D. (Ed.), *Developments in Food Analysis Technique 2*. London: Applied Science Publishers Ltd., pp. 185-224 (1980)
 - 177 Bouza, J., Kimarei, A. and Karel, M. Effect of extraction procedure on fluorescent chromophores in milk. *Journal of Food Science*, **50**, 1515-1516 (1985)
 - 178 Weist, J.L. and Karel, M. Development of a fluorescence sensor to monitor lipid oxidation. II. The kinetics of chitosan fluorescence formation after exposure to lipid oxidation volatiles. *Food Biotechnology*, **6** (3), 273-293 (1992)
 - 179 Keen, A. R.; Boon, P. M. and Walker N. J. Off-Flavour in stored whole milk powder I. Isolation of monocarbonyl classes. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **11**, 180-188 (1976)
 - 180 Boon, P. M.; Keen, A. R. and Walker, N. J. Off-Flavour in stored whole milk powder II. Separation and identification of individual monocarbonyl components. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **11**, 189-195 (1976)
 - 181 Badings, H.T. and Wassink, J.G. Separation and identification of aliphatic aldehydes and ketones by thin-layer chromatography of the 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Netherland Milk and Dairy Journal*, **17**, 132-149 (1963)
 - 182 Mc Carty, W.O. and Hansen, A.P. Effects of ultrahigh temperature steam injection processing on composition of carbonyls in milk fat. *Journal of Dairy Science*, **64**, 581-587 (1981)
 - 183 Gaba, K.L. and Jain, M.K. Organoleptic and chemical evaluation of flavour changes during storage of ghee prepared from fresh and ripened desi butters. *Indian Journal of Dairy Science*, **28**, 278-288 (1975)
 - 184 Gaba, K.L. and Jain, M.K. Headspace carbonyls in fresh and stored ghee. *Indian Journal of Dairy Science*, **29**, 1-6 (1976)
 - 185 Johnson, D.C. and Hammond, E.G. A sensitive method for the determination of carbonyl compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **48**, 653-656 (1971)
 - 186 van Schalm. Determination of traces of formaldehyde in milk as the 2,4-dinitrophenylhydrazone by HPLC. *Netherland Milk and Dairy Journal*, **37**, 59-64 (1983)
 - 187 Reindl, B. and Stan, H.J. Determination of volatile aldehydes in meat as 2,4-dinitrophenylhydrazones using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**, 849-854 (1982)
 - 188 Lane, R.H. Monitoring aldehyde production during frying by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **74** (6), 957-960 (1991)
 - 189 Koizumi, H. and Suzuki, Y. High-performance liquid chromatography of aliphatic aldehydes by means of post-column extraction with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography*, **457**, 299-307 (1988)
 - 190 Snyder, J.M., Frankel, E.N., Selke, E. and Warner, K. Comparison of gas chromatographic methods for volatile lipid oxidation compounds in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **65**, (1617-1620) (1988)
 - 191 Dupuy, H.P., Rayner, E.T., Waldsworth, J.I. and Legendre, M.G. Analysis of vegetable oils for flavor quality by direct gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **54**, (445-449) (1977)
 - 192 Dupuy, H.P., Flick, G.J. Jr, Bailey, M.E., St Angelo, A.J., Legendre, M.G. and Sumrell, G. Direct sampling capillary gas chromatography of volatiles in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **62**, (1690-1963) (1985)
 - 193 Warner, K., Evans, C.D., List, G.R., Depuy, H.P., Wadsworth, J.I. and Goheen, G.E. Flavor score correlation with pentanal and hexanal contents of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **55**, (252-256) (1978)
 - 194 Min, D.B. Correlation of sensory evaluation and instrumental gas chromatographic analysis of edible oils. *Journal of Food Science*, **46**, 1453-1456 (1981)
 - 195 Bassette, R. and Ward, G. Measuring parts per billion of volatile materials in milk. *Journal of Dairy Science*, **58**, 428-429 (1975)
 - 196 Ulberth, F. and Roubicek, D. Monitoring of oxidative deterioration of milk powder by headspace gas chromatography. *International Dairy Journal*, **5**, 523-531 (1995)
 - 197 Forss, D.A., Jacobsen, V.M. and Ramshaw, E.H. Concentration of volatile compounds from dilute aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **15**, 1104-1107 (1967)
 - 198 Tanimura, S., Nakabayashi, A. and Katayama, H. Development of propionaldehyde in cultured butter during storage. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **17**, 47-53 (1982)
 - 199 Fritsch, C.W. and Gale, J.A. Hexanal as a measure of rancidity in low fat foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **54**, 225-228 (1977)
 - 200 Jeng, W., Bassette, R. and Crang, R.E. Effects of light and copper ions on volatile aldehydes of milk and milk fractions. *Journal of Dairy Science*, **71**, 2366-2372 (1988)
 - 201 Bassette, R. and Jeon, I.J. Effect of process- and storage -times and temperatures on concentration of volatile materials in ultra-high-temperatures steam infusion

- processed milk. *Journal of Food Protection*, **46**, 950-953 (1983)
- 202 von Sydow, E., Andersson, J., Ajou, K. and Karlsson, G. The aroma of bilberries. II. Evaluation of the press juice by sensory methods and by gas chromatography and mass spectrometry. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **3**, 11-17 (1970)
- 203 Selke, E., Frankel, E.N. Dynamic headspace capillary gas chromatographic analysis of soybean oil volatiles. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **64**, 749-753 (1987)
- 204 Park, P. S. W. and Goins, R. E. Determination of volatile lipid oxidation products by dynamic headspace-capillary gas chromatographic analysis with application to milk-based nutritional products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1581-1585 (1992)
- 205 Mills, O.E. A headspace sampling method for monitoring flavour volatiles of protein products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, **21**, 49-56 (1986)
- 206 Leland, J. V., Reineccius, G.A. and Lahiff, M. Evaluation of copper-induced oxidized flavor in milk by discriminant analysis of capillary gas chromatographic profiles. *Journal of Dairy Science*, **70**, 524-533 (1987)
- 207 Hall, G. and Lingnert, H. Analysis and prediction of lipid oxidation in foods. In: Charalambous, G (Ed.), *The shelf Life of Foods and Beverages*, Proceedings of the 4th International Conference, Rhodes, 23-26 July 1985. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp. 735-743 (1986)
- 208 Murray, K.E. Concentration of headspace, airborne and aqueous volatiles on chromosorb 105 for examination by gas chromatography and gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, **135**, 49-60 (1977)
- 209 Badings, H.T and de Jong, C. Headspace analysis for the study of aroma compounds in milk and dairy products. In: Schreier, P. (Ed.), *Analysis of Volatiles. Methods. Applications*. Berlin and New York: Walter de Gruyter, pp. 401-417 (1984)
- 210 Bosset, J.O. and Mariaca, R. Instrumental analysis of volatile flavour compounds of milk and dairy products. A review. *Le Lait*, à paraître (1966)
- 211 Santner, A., Binder, E. and Brandl, E. Zur Bestimmung der Oxidationsstabilität von Vollmilchpulver. I. Optimierung eines Methodenvorschlags. *Österreichische Milchwirtschaft*, **3** (6), 15-21 (1980)
- 212 Santner, A., Binder, E. and Brandl, E. Zur Bestimmung der Oxidationsstabilität von Vollmilchpulver. II. Vergleichende Prüfung verschiedener Verfahren zur Bestimmung der Oxidationsstabilität von Vollmilchpulver. *Österreichische Milchwirtschaft*, **4** (7), 23-26 (1980)
- 213 Pardun, H. and Kroll, E. Der Schaal-Test, ein einfaches Mittel zur Bestimmung der Oxidationsstabilität von Ölen und Fetten. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **66**, 413-421 (1970)
- 214 Hadorn, H., and Zürcher, K. Zur Bestimmung der Oxidationsstabilität von Ölen und Fetten. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **70**, 57-65 (1974)
- 215 deMan, J.M., Tie, F. and deMan, L. Formation of short chain volatile organic acids in the automated AOM method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **64**, 993-996 (1987)