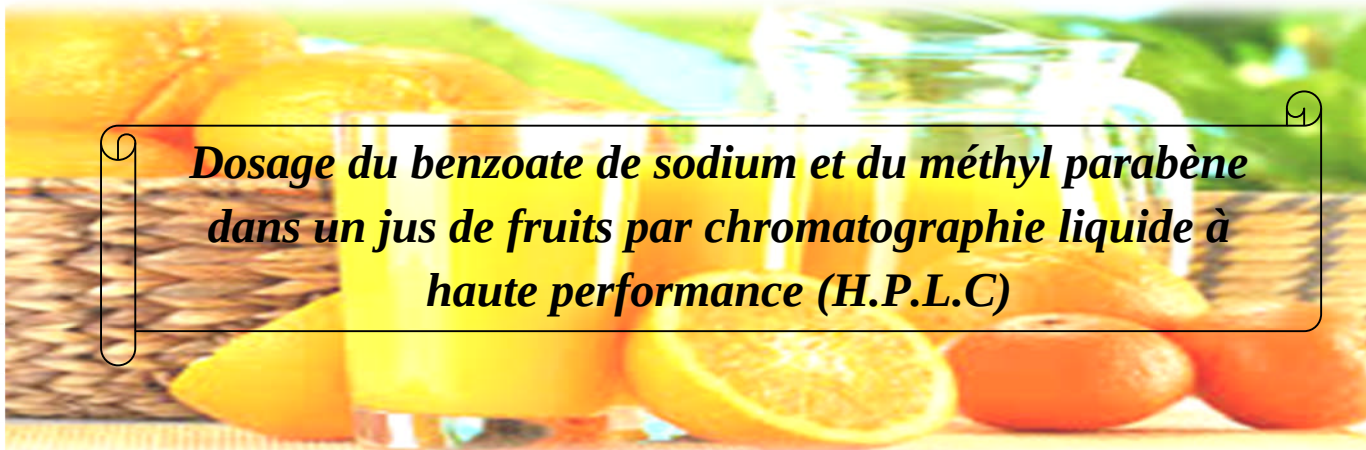


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie - Microbiologie



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de MASTER
Option : Biochimie Appliquée

Thème :



***Dosage du benzoate de sodium et du méthyl parabène
dans un jus de fruits par chromatographie liquide à
haute performance (H.P.L.C)***

Dirigé par : M^{me} OUALI-ABDOUNE S.

Maitre assistante « A », chargée de cours à l'UMMTO.

Présenté par :

♣ M^{lle} ABDOUNE Sabrina

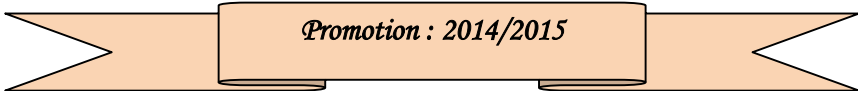
♣ M^{lle} MEZAGUER Tassadit

Devant le jury :

Président : M^R AMROUCHE T. Maitre de conférences « A » à l'UMMTO.

Examineurs : M^R SADOUDI R. Maitre de conférences « B » à l'UMMTO.

M^{lle} DERMECHE S. Maitre assistante « A », chargée de cours à l'UMMTO.



Promotion : 2014/2015



Remerciements



 A l'issu de ce travail nous remercions tout d'abord le bon Dieu le tout puissant qui nous a éclairé les chemins par sa lumière et

qui nous a procuré le courage, la volonté, l'aide et la patience pour réaliser ce modeste travail.

 Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude aux personnes, qui grâce à leur aide, notre travail a vu le jour :

 Notre promotrice et ma mère M^{me} OUALI-ABDOUNE S. Maitre assistante chargée de cours à La faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'UMMTO, pour avoir assuré notre encadrement, pour le temps qu'elle nous a consacré, pour ses précieux conseils et sa disponibilité. Nous lui souhaitons la réussite dans ses projets.

 Nous tenons à remercier les membres du jury d'avoir accepter d'examiner notre travail :

 M^R AMROUCHE T. maitre de conférences « A » ;

 M^R SADOUDI R. maitre de conférences « B » ;

 M^{elle} DERMECHE S. maitre assistante « A ».

 Nous exprimons nos remerciements à D^r MAMOU. Docteur pharmacien de nous avoir accueilli au sein du laboratoire de chimie analytique en biomédicale et à tout le personnel du laboratoire de nous avoir aidées et orientées.

 Un merci à M^r TIGHRINE A. pour son aide.

 Nos profonds remerciements sont adressés à l'ensemble du personnel du laboratoire d'Hydro-bromatologie pour leur gentillesse et leur aide.

 Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.





Dédicaces

- *A la mémoire de mon défunt père, qui nous a quitté très tôt mais qui est toujours présent dans mon cœur ; j'espère que je serai toujours à la hauteur de ses espérances.*
- *A ma chère mère ; Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.*

- *A mes très chères sœurs Rozana et Amira.*
- *Mes grands parents maternels et paternels.*
- *Mes oncles et tantes maternels et paternels.*

- *A mon fiancé Abdenour et à toute la famille « Oudjebour ».*
- *Mon binôme tassadit ainsi qu'à toute sa famille.*

- *A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.*
- *A tous mes enseignants de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, surtout mes enseignants du département BMC.*

Sabrina





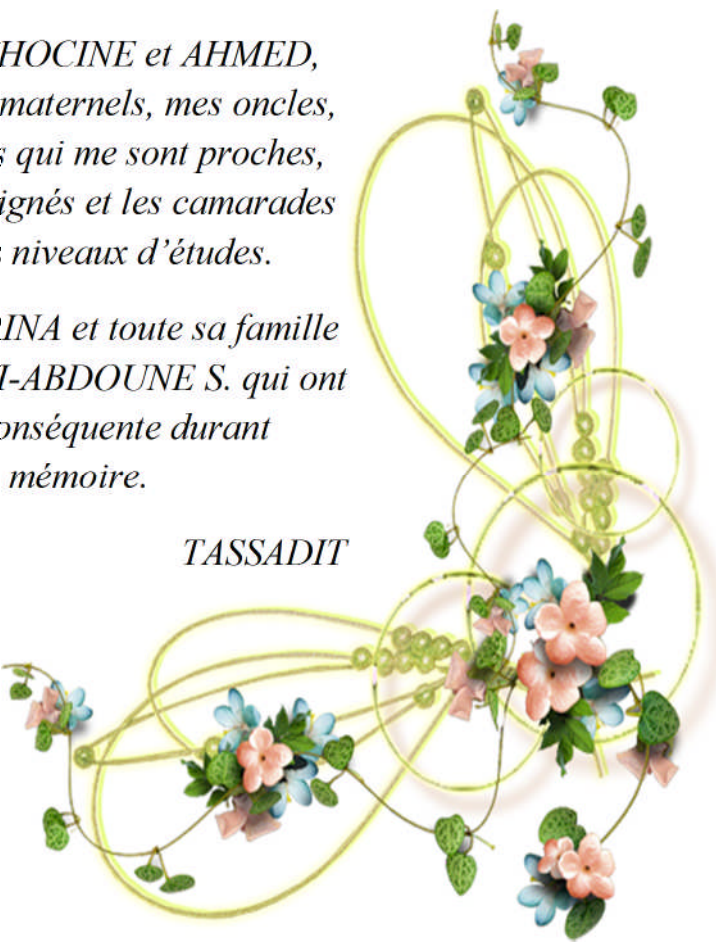
Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes chers parents qui ont déployé tous leurs efforts pour m'élever à ce niveau d'étude et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Sans oublier mes deux frères: HOCINE et AHMED, mes grand parents paternels et maternels, mes oncles, mes tantes et tout ceux et celles qui me sont proches, mes professeurs qui m'ont enseignés et les camarades que j'ai fréquenté à tout les niveaux d'études.

Sans oublier mon binôme SABRINA et toute sa famille ainsi ma promotrice M^{me} OUALI-ABDOUNE S. qui ont apporté une contribution conséquente durant l'élaboration de ce mémoire.

TASSADIT



ADDITIFS ALIMENTAIRES

Dr. Linus PAULING (1901-1994) :

« Une alimentation optimale est la médecine de demain »



-SOMMAIRE-

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction générale.....	01

Partie bibliographique

Chapitre I : Les jus de fruits

I.1. Définition et caractéristiques d'un jus de fruits.....	02
I.2. Classification des jus de fruits.....	02
I.2.1. Les purs jus de fruits.....	02
I.2.2. Les jus de fruits à base de concentrés.....	02
I.2.3. Les jus de fruits déshydratés.....	02
I.2.4. Nectar de fruits.....	02
I.2.5. Jus gazéifié.....	02
I.3. Composition chimique et valeur nutritionnelle des jus de fruits.....	02
I.4. Technologie de fabrication des jus de fruits.....	05
I.5. La conservation des jus de fruits.....	07
I.5.1. Les traitements thermiques.....	07
I.5.1.1. La conservation par la chaleur.....	07
I.5.1.2. La conservation au froid.....	08
I.5.2. Conservation chimique.....	09
I.6. Les altérations des jus de fruits.....	09
I.6.1. Altérations biochimiques.....	09
I.6.2. Altérations microbiologiques.....	10

Chapitre II : Les conservateurs alimentaires

II.1. Définition et caractéristiques des additifs alimentaires.....	11
II.1.1. Définition.....	11
II.1.2. Origine des additifs alimentaires.....	11
II.1.3. Classification et numérotation des additifs alimentaires.....	11
II.1.3.1. Additifs alimentaires modifiants le gout.....	12
II.1.3.2. Additifs alimentaires modifiants la couleur.....	13
II.1.3.3. Additifs alimentaires modifiants la texture.....	14
II.1.3.4. Additifs alimentaires assurant la conservation.....	14
II.1.4. Rôle des additifs alimentaires.....	15
II.1.5. Réglementation des additifs alimentaires.....	15
II.2. Les conservateurs alimentaires.....	17
II.2.1. Types de conservateurs alimentaires.....	17
II.2.2. Acide benzoïque, ses dérivés et leurs caractéristiques.....	19
II.2.2.1. Le benzoate de sodium.....	20
II.2.2.2. Les parabènes.....	20
II.2.3. Mode d'action du benzoate de sodium et du méthyl parabène.....	21
II.2.4. Utilisation des conservateurs alimentaires.....	23
II.2.4.1. Benzoate de sodium.....	23
II.2.4.2. Les parabènes.....	23
II.2.5. Méthodes de dosage des additifs alimentaires.....	23

Chapitre III : La chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C)

III.1. Généralités et définition de la chromatographie liquide à haute performance.....	25
III.2. Principe de la chromatographie liquide à haute performance.....	25
III.3. Les supports de la chromatographie liquide à haute performance.....	25
III.4. L'appareillage de l'H.P.L.C.....	27
III.5. Exploitation des résultats d'une H.P.L.C.....	29
III.6. Domaines d'applications.....	29
III.7. Les caractéristiques de l'H.P.L.C.....	30
III.8. Les avantages et les inconvénients.....	30

Partie pratique

Chapitre IV : Matériel & méthodes

IV.1. Matériel & méthodes.....	31
IV.1.1. Matériel.....	31
IV.1.2. Méthodes d'analyses.....	31
IV.1.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons.....	31
IV.1.2.2. Techniques d'analyses utilisées.....	32
❖ Validation analytique de la méthode (H.P.L.C).....	32
❖ Dosage du benzoate de sodium dans le jus analysé.....	33
1/ Préparation de la gamme standard.....	33
2/ Préparation de la gamme pour dosage (les échantillons à analyser).....	34
3/ Préparation de l'appareil à (H.P.L.C).....	34
4/ Calcul de la concentration de benzoate de sodium.....	34
❖ Dosage du méthyl parabène dans le jus de fruits analysé.....	36
1/ Validation analytique de l'appareil.....	36
2/ Préparation de la gamme standard	36
3/ Préparation de la gamme pour dosage.....	37
4/ Les conditions chromatographiques pour le méthyl parabène.....	37
5/ Calcul de la concentration du méthyl parabène.....	37
❖ Analyse d'un échantillon de jus témoin « sans conservateurs ».....	39

Chapitre V : Résultats & discussion

V.1.1. Résultats du dosage de benzoate de sodium.....	40
V.1.2. Résultats du dosage de méthyl parabène.....	43
V.1.3. Résultats de l'analyse de l'échantillon témoin « sans conservateurs ».....	46
Conclusion générale.....	47

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

<i>figure</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
01	- Etapes générales de la fabrication d'un jus de fruits	06
02	- Altération d'un jus de fruits	10
03	- Structure générale de l'acide benzoïque	20
04	- Formule générale du benzoate de sodium (E211)	20
05	- Structure générale d'un parabène	21
06	- Force ou pouvoir d'élution des solvants utilisés comme phases mobiles	26
07	- Configuration typique du système d'H.P.L.C	27
08	- Courbe d'étalonnage : Aire de pic ($\mu\text{V} \cdot \text{min}$) du benzoate de sodium en fonction de sa concentration (mg/ml)	33
09	- Chromatogramme de l'échantillon n° 10	35
10	- Chromatogramme d'une prise standard de méthyl parabène	37
11	- Chromatogramme de l'échantillon de jus n° 13	38
12	- Chromatogramme de l'échantillon de jus n° 02	41
13	- Chromatogramme de l'échantillon de jus n° 15	41
14	- Chromatogramme d'un échantillon de jus n° 15	44
15	- Chromatogramme de l'échantillon de jus n° 05	44
16	- Chromatogramme du jus de fruits témoin « sans conservateurs »	46

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	- Composition chimique d'un jus de fruits	03
II	- Composition nutritionnelle des jus de fruits	05
III	- Avantage d'utilisation d'additifs alimentaires	09
IV	- Liste des additifs alimentaires selon la directive CE n°89/107 du 21 décembre 1988	11
V	- Numérotation des additifs alimentaires	12
VI	- Quelques exemples d'édulcorants et leurs structures	13
VII	- Quelques colorants utilisés en industries agro-alimentaires et leurs structures	14
VIII	- Représentation de quelques additifs alimentaires et leurs DJA	16
IX	- Les principaux conservateurs autorisés et leurs natures	19
X	- Pourcentage d'acide non dissocié à différents pH	22
XI	- Résultats de dosage du benzoate de sodium	40
XII	- Résultats de dosage du méthyl parabène dans le jus analysé	43

Liste des abréviations :

- **$\mu\text{V} \cdot \text{min}$** : microvolt par minute.
- **AESA** : Autorité européenne de sécurité des aliments.
- **AFSSPS** : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.
- **ATP_{ase}** : Adénosine tri phosphatase.
- **BE** : Brunissement enzymatique.
- **BNE** : Brunissement non enzymatique.
- **CCM** : Chromatographie sur couche mince.
- **CE** : comité européenne.
- **CEE** : Communauté économique européenne.
- **C_f** : Concentration finale.
- **C_i** : Concentration initiale.
- **CLHP** : chromatographie liquide à haute pression.
- **CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.
- **CSAH** : Comité scientifique de l'alimentation humaine.
- **DES** : Dose sans effet.
- **DJA** : Dose journalière admissible.
- **H^+** : protons.
- **JECFA** : Joint Expert Committee on Food Additives.
- **mV** : millivolt.
- **Nm** : nanomètre.
- **NS** : Non spécifiée.
- **P.p.m** : particules par millions.
- **P.S** : pouvoir sucrant.
- **Pas** : Pascal.
- **pH_e** : potentiel d'hydrogène externe.
- **pH_i** : potentiel d'hydrogène interne.
- **RP** : (reverse phase) ou phase inverse.
- **SIN** : System International Numbering.
- **SM** : Spectrométrie de masse.
- **WHO** : World health organization.

Résumé

A partir du 19ème siècle, les conservateurs chimiques ont fait leur apparition en même temps que l'industrie agro-alimentaire. Depuis, ils n'ont cessé de se développer dans un double but : qualité mais aussi sécurité des aliments.

Comme tous les additifs, les conservateurs sont encadrés par différentes directives européennes et codifiés de « E 200 à E 297 ». Ces directives relatives aux conservateurs précisent, comme pour les autres additifs qu'ils doivent justifier de leur nécessité technologique et ne pas nuire à la santé du consommateur. Si le premier point est toujours bien clair, il n'en est pas de même pour certains conservateurs notamment le benzoate de sodium toxique et cancérigène en cas de non respect de la dose autorisée, et le méthyl parabène interdit par la réglementation.

Dans cette étude, nous avons procédé au dosage de ces deux conservateurs dans quinze (15) échantillons provenant d'un jus très apprécié et très consommé chez nous. Pour le réaliser, nous avons utilisé une technique des plus performante et sophistiquée et la plus préconisée pour ce type de dosage, il s'agit de la chromatographie liquide haute pression en phase inverse (**RP-HPLC**).

Les résultats obtenues concernant le benzoate de sodium, ont révélé des concentrations qui oscillaient entre 110 et 219,08 ppm, ce qui est conforme aux normes requises et même très inférieures aux limites autorisées par le codex alimentarius qui est de 1000 ppm. Par contre, pour le méthyl parabène, on a enregistré des doses importantes allant jusqu'à 15,53 ppm, alors que la réglementation a interdit son usage dans tous les aliments vu sa toxicité élevée.

De ce fait, nous pouvons dire que l'unité de production de ce jus, n'a pas respecté la réglementation quand à l'utilisation de ce conservateur dangereux ce qui constitue une infraction à la loi et à la réglementation en vigueur. De plus, la mention du méthyl parabène n'a pas été signalée sur l'emballage de notre produit, ce qui constitue une adultération et une tromperie à l'égard du consommateur.

Mots clés : Jus de fruits, conservateurs alimentaires, HPLC, benzoate de sodium, méthyl parabène, réglementation.

Abstract

From the 19th century, the chemical preservatives (curators) made their appearance at the same time as the food-processing industry. Since then, they did not stop developing in a double purpose: quality but also food safety.

As all the additives, the preservatives (curators) are framed by various european directives and codified of “E 200 in E 297”. These directives relative to the preservatives specify, as for the other additives which they have to justify their technological necessity and not damage the health of the consumer. If the first point is always very clear, it is not the same for certain preservatives in particular toxic and carcinogenic sodium benzoate in case of non compliance with the authorized dose there, and the methyl paraben forbidden by the regulations.

In this study, we proceeded to the dosage of these two preservatives in fifteen (15) samples resulting from a very appreciated and very consummate juice at our home. To realize it, we used a technique of most successful and most sophisticated and the most recommended for this type of dosage, it is about the high-performance liquid chromatography in inverse phase (**RP-HPLC**).

The results obtained concerning the benzoate of sodium, revealed concentrations which oscillated between 110 ppm and 219.08 ppm, what is in compliance with the standards required and even very lower than the limits authorized by the codex alimentarius which is 1000 ppm. On the other hand, for the methyl paraben, we registered going important doses 15.53 ppm, while the regulations forbade his use in all the food seen his high toxicity.

Therefore, we can say that the production unit of this juice, did not respect the regulations when in the use of this dangerous preservatives what establishes a breach of the law and in the regulations in force. Furthermore, the mention of the methyl paraben was not indicated on the packaging of our product, what establishes an adulteration and a deceit towards the consumer.

Keywords: Juice, food preservatives, HPLC, sodium benzoate, methyl paraben, regulation.

Introduction

La filière des jus de fruits, occupe une part très importante dans l'activité industrielle. Elle est d'autant plus présente que le consommateur trouve d'énormes difficultés à faire un choix, devant la panoplie de produits proposés. Ces industries ont pour objectif de transformer les fruits en jus, afin de prolonger leur durée de consommation au delà de leur saison, et faire profiter ainsi durant toute l'année le consommateur, de leur qualité nutritionnelle.

La fabrication du jus de fruits prêt à consommer, nécessite une succession d'opérations unitaires qui doivent être optimisées pour assurer un niveau de productivité suffisant, sans nuire ni à la qualité du produit, ni à la sécurité du consommateur. Le défi du technologue est de parvenir à assurer la stabilité colloïdale et la stabilité microbienne tout en conservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques de la boisson.

La principale fonction de la conservation est donc de retarder l'altération des jus de fruits et d'empêcher toute modification de leur goût ou, parfois, de leur aspect. Cet objectif peut être atteint de différentes manières, grâce à des procédés de traitement comme la mise en boîte (appertisation), la déshydratation (séchage), la congélation, l'emballage et l'utilisation d'additifs tels que les conservateurs alimentaires (**BRANGER et al, 2007**).

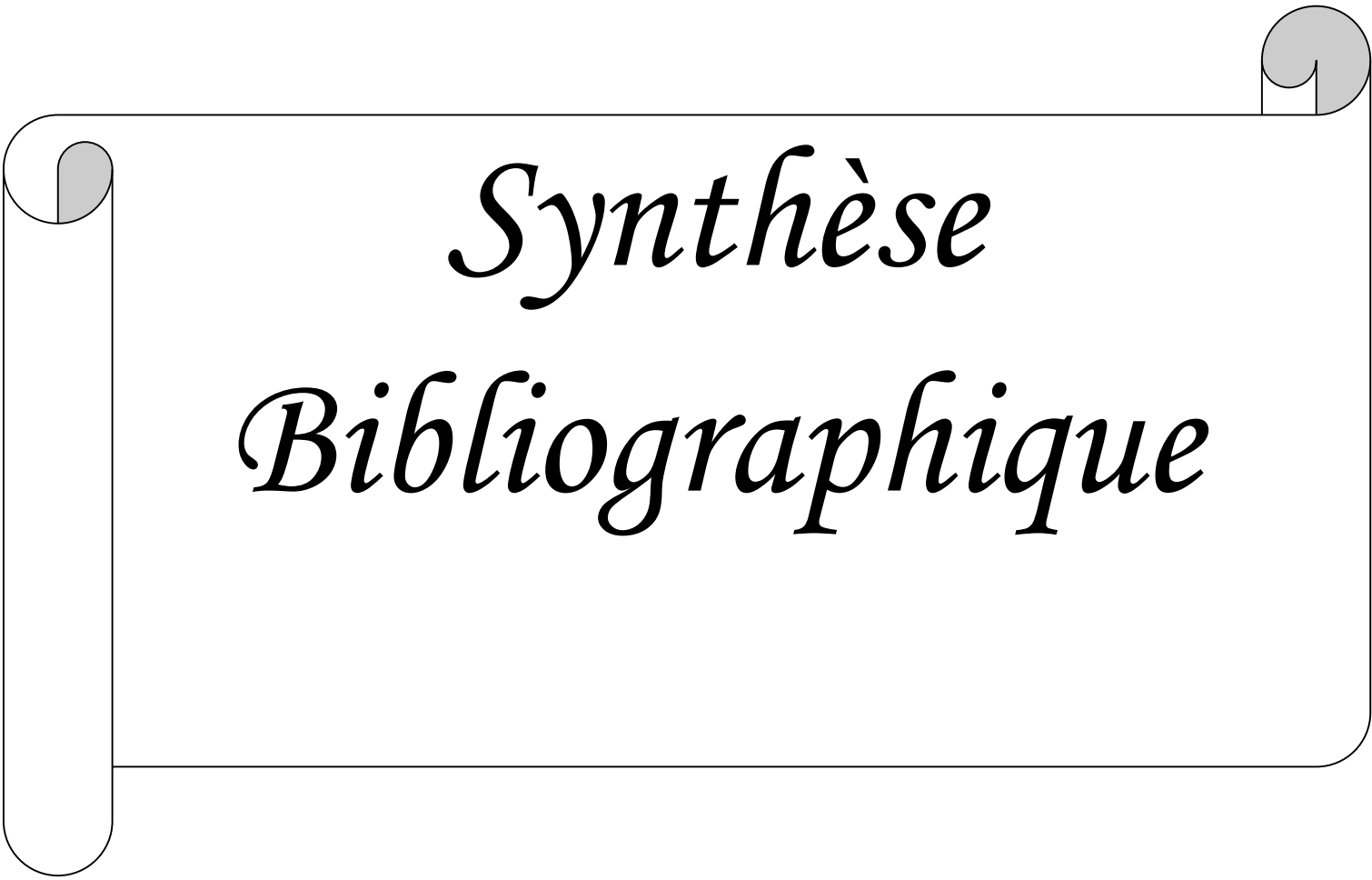
L'usage de conservateurs constitue une réelle avancée dans les domaines alimentaire et sanitaire. Ils permettent d'allonger la durée de vie des aliments transformés et de garantir une sécurité sanitaire face aux bactéries pathogènes et aux autres micro-organismes responsables de toxi-infections alimentaires.

Cependant, l'utilisation de manière disproportionnée et frauduleuse de ces conservateurs par certains industriels, l'innocuité de certains d'entre eux et l'évolution du droit des consommateurs, ont permis d'instaurer progressivement un régime d'autorisation imposant des évaluations toxicologiques systématiques, introduites principalement sous l'égide d'institutions telles que l'OMS, la FAO, le Codex Alimentarius et l'Agence Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA).

En effet, l'objectif principal de ces organismes, repose sur le principe des listes positives c'est-à-dire autoriser ou interdire l'utilisation de ces substances chimiques par précaution. Car, s'il est un domaine où le principe de précaution doit s'appliquer, c'est bien en effet la santé humaine (**VASANTHA RUPASINGH et YU, 2012**).

Dans ce contexte, et afin de se faire une idée sur l'utilisation de ces conservateurs par nos industriels, nous nous sommes proposé de doser certains conservateurs dans un jus de fruit très consommé et très apprécié chez nous. Les conservateurs en question sont : le benzoate de sodium, composé toxique en cas de non respect de la dose autorisée, et le méthyl parabène dont l'usage est interdit par la réglementation.

Pour ce dosage, nous allons utiliser une technique des plus préconisée pour ce type de composés, et des plus sophistiquée et performante ; il s'agit de la chromatographie liquide haute pression en phase inverse « **RP - HPLC** ».

A decorative graphic of a scroll with a light gray background and a black outline. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges showing a dark gray inner layer. The title is centered on the unrolled portion.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Le jus de fruits



I.1. Définition et caractéristiques d'un « Jus de fruits » :

Le jus de fruits est le liquide non fermenté mais fermentescible, tiré de la partie comestible de fruits sains, parvenus au degré de maturation approprié et frais, ou de fruits conservés dans de saines conditions par des moyens adaptés et/ou par des traitements de surface post-récolte appliqués conformément aux dispositions pertinentes de la Commission du Codex Alimentarius.

I.2. Classification des jus de fruits :

La diversification des procédés de fabrication ou d'extraction, a donné naissance aux différents types de jus de fruits. On distingue :

I.2.1. Les purs jus de fruits : obtenus d'une seule espèce de fruits, pressés directement par des procédés mécaniques ; ils ne contiennent aucun additif et n'ont pas d'adjonction de sucre. Ils sont dits « **100% pur jus de fruits** » (ANONYME 1).

I.2.2. Les jus de fruits à base de concentrés : ce sont des jus reconstitués, obtenus à partir du jus de fruits concentré auquel on additionne la même quantité d'eau évaporée lors de l'opération de concentration (BENAMARA, 2003).

I.2.3. Les jus de fruits déshydratés : ces produits se caractérisent par une déshydratation totale de la quasi-totalité de l'eau de reconstitution. Ces produits peuvent être concentrés et reconstitués.

I.2.4. Nectar de fruits : est un produit obtenu en combinant le jus de fruits, jus de fruits concentrés et déshydratés, purée de fruits ou un mélange de ces produits, avec de l'eau et du sucre et/ou de miel et/ou d'édulcorants (dans les limites spécifiées) (CODEX STAN 245-2005).

I.2.5. Jus gazéifié: est un jus saturé en gaz carbonique qui augmente sa propriété rafraichissante, sa valeur alimentaire et sa conservation (NICKLAS *et al*, 2014).

I.3. Composition chimique et valeur nutritionnelle des jus de fruits :

Les jus de fruits contiennent tous les éléments nutritifs des fruits, exceptés les fibres qui sont le plus souvent en teneur réduite. Ils apportent de l'eau (**85 à 90%**), les glucides (saccharose, fructose, glucose et le sorbitol), les vitamines (A, B₁, B₂, B₆, B₃, B₉, C, l'acide pantothénique...), les minéraux et les constituants « non nutritifs » des fruits (polyphénols, caroténoïdes, flavonoïdes, limonènes, terpènes,...) (UCKOO *et al*, 2012).

Leur procédé de fabrication conduit donc à une ressemblance quasi-parfaite avec les fruits dont ils sont issus.

Le tableau (I) résume la composition chimique d'un jus de fruits :

Tableau (I) : Composition chimique d'un jus de fruits (ANONYME 2)

<i>Constituants</i>	<i>Unité</i>	<i>Teneur moyenne pour 100 ml de jus de fruits</i>
Energie	<i>Kcal</i>	39.1
Eau	<i>g</i>	88.9
Proteine	<i>g</i>	0.59
Glucide	<i>g</i>	8.8
Lipides	<i>g</i>	0.17
Fibres alimentaires	<i>g</i>	0.2
Amidon	<i>g</i>	0
Sodium	<i>mg</i>	2.3
Magnésium	<i>mg</i>	10.3
Phosphore	<i>mg</i>	14.9
Potassium	<i>mg</i>	166
Calcium	<i>mg</i>	12.8
Manganèse	<i>mg</i>	0.07
Fer total	<i>mg</i>	0.18
Cuivre	<i>mg</i>	0.03
Zinc	<i>mg</i>	0.05
Sélénium	<i>µg</i>	0.5
Iode	<i>µg</i>	1.5
Béta-carotène	<i>µg</i>	91
Activité vitaminique E (Alpha tocophérol)	<i>mg</i>	0.16
Vitamine C	<i>mg</i>	32.9
Vitamine B₁ (Thiamine)	<i>mg</i>	0.06
Vitamine B₂ (Riboflavine)	<i>mg</i>	0.03
Vitamine B₃ (Niacine)	<i>mg</i>	0.36
Vitamine B₅ (Acide pantothénique)	<i>mg</i>	0.17
Vitamine B₆ (Pyridoxine)	<i>mg</i>	0.06
Vitamine B₉ (Folates totaux)	<i>µg</i>	21.2
Vitamine B₁₂ (Cobalamine)	<i>µg</i>	0

- Les jus de fruits naturels ont un apport énergétique identique à celui des fruits, puisqu'ils ne contiennent pas d'ajout de sucre. Un verre de jus de fruits apporte entre 30 et 90 kcal, comme un fruit moyen (150 g) (**ANONYME 3**).
- **Les acides organiques** : la qualité d'un jus de fruits est fortement influencée par le profil d'acides organiques qui est un indice utile de l'authenticité du produit des fruits (**DILLARD et GERMAN, 2000 ; FERNANDEZ-FERNANDEZ et al,**

2010). La nature et la concentration des acides organiques présents dans les fruits sont intéressantes en raison de leur influence sur la stabilité des propriétés organoleptiques du jus de fruits (**KADER, 2008 ; SCHERER et al, 2012**).

- **Caroténoïdes** : sont des composés isopréniques, certains sont des précurseurs de la vitamine A, comme la bêta-carotène (carottes, pêches, abricots) ; les caroténoïdes rencontrés dans les jus de fruits sont : le lycopène (tomate surtout, raisin, pastèque, pamplemousse), la lutéine (orange, pêche, mangue), l'alpha-carotène (carotte), la bêta-cryptoxanthine (orange, papaye, pêche), la canthaxanthine (chanterelle), la zéaxanthine (pêche, pépins d'orange, agrumes...) (**MA et al, 2012**).
- **Les antioxydants** :
 - ✚ **Les polyphénols** : sont les principales substances actives dans les fruits avec une teneur qui se situe entre 2 et 500 mg/l. Ils sont présents dans différentes parties de chaque fruit (**ANDRE, 2015**).
 - ✚ **Les flavonoïdes** : La majorité des flavonoïdes du jus d'orange appartient au groupe des *flavonone glycosides*. Ils sont importants car certains de ces composés sont aussi responsables de l'amertume du jus. Ils sont disponibles en quantité assez élevée dans le jus de fruits (**LEE et al, 2012**).
 - ✚ **Les Limonoïdes** : sont des triterpènes qui se trouvent à faibles concentrations dans les divers agrumes. Leur concentration dépend de la variété, de la période de récolte et de la région géographique de provenance. les limonoïdes sont les plus abondants dans le jus d'orange (**ASADPOOR et al, 2014**).
- **Les fibres** : Le pressage élimine en partie les fibres : on retrouve cependant dans le jus de fruits des fibres douces (pectines) contenues dans la pulpe, bien tolérées (**DOROTA, 2014**).
- **Les substances aromatiques** : Bien qu'elles soient présentes en faibles quantités dans les jus de fruits, elles confèrent aux jus un goût et une odeur caractéristique. Elles sont un mélange d'aldéhydes, de cétones, d'alcools, d'esters et d'autres composés. Les fruits (matières premières) renferment souvent, jusqu'à 100 précurseurs aromatiques (**HUANG et al, 2005, PRIOR et CAO, 2000**).

La composition nutritionnelle de différents types de jus de fruits est donnée dans le tableau (II)

Tableau (II) : Composition nutritionnelle des jus de fruits (ANONYME 4).

Pour 100 ml	Jus de pomme	Jus de raisin	Jus d'orange	Jus de pomelo	Jus d'ananas
Energie (Kcal)	45	61	40	41	51
Glucides (g)	11	15	8,8	8,8	11,9
Eau	87,4	83,1	88,8	89	86,2
Vitamine C (mg)	Traces	Traces	30-50	29-38	9-11
Provitamine A (Béta-carotène (µg))	Traces	15	42-70	4-6	10-20
Vitamine B9 (µg)	1	3	20-30	7-10	10
Potassium (mg)	120	140	180	150	127
Magnésium (mg)	5	10	11	10	12
Calcium (mg)	6	17	10	9	15



I.4. Technologie de fabrication des jus de fruits :

Les processus de fabrication des jus de fruits constituent un enchainement d'opération diverses et unitaires permettant de réaliser et d'assurer (garantir) un produit de qualité sans nuire à la santé ni à la sécurité des consommateurs. Cependant, il existe plusieurs séries de fabrication d'un jus de fruits qui dépendent de :

- ❖ La nature et de la composition du fruit ;
- ❖ Les caractéristiques du jus de fruits (jus limpide, clair, visqueux...) ;
- ❖ Le produit fini que l'on souhaite obtenir (jus pur, concentré...etc....).

La qualité d'un jus de fruits est directement liée à la qualité des matières premières utilisées au départ qui celle-ci dépend de :

- ❖ Type de variété produite (exemple : tardives en orange = meilleure qualité) ;
- ❖ La fraîcheur et le degré de maturité ;
- ❖ le climat et le sol ;
- ❖ La qualité sanitaire (**ELEFTHERIADOU *et al*, 1998**).

La figure (1) schématise d'une façon générale le diagramme de fabrication d'un jus de fruits.

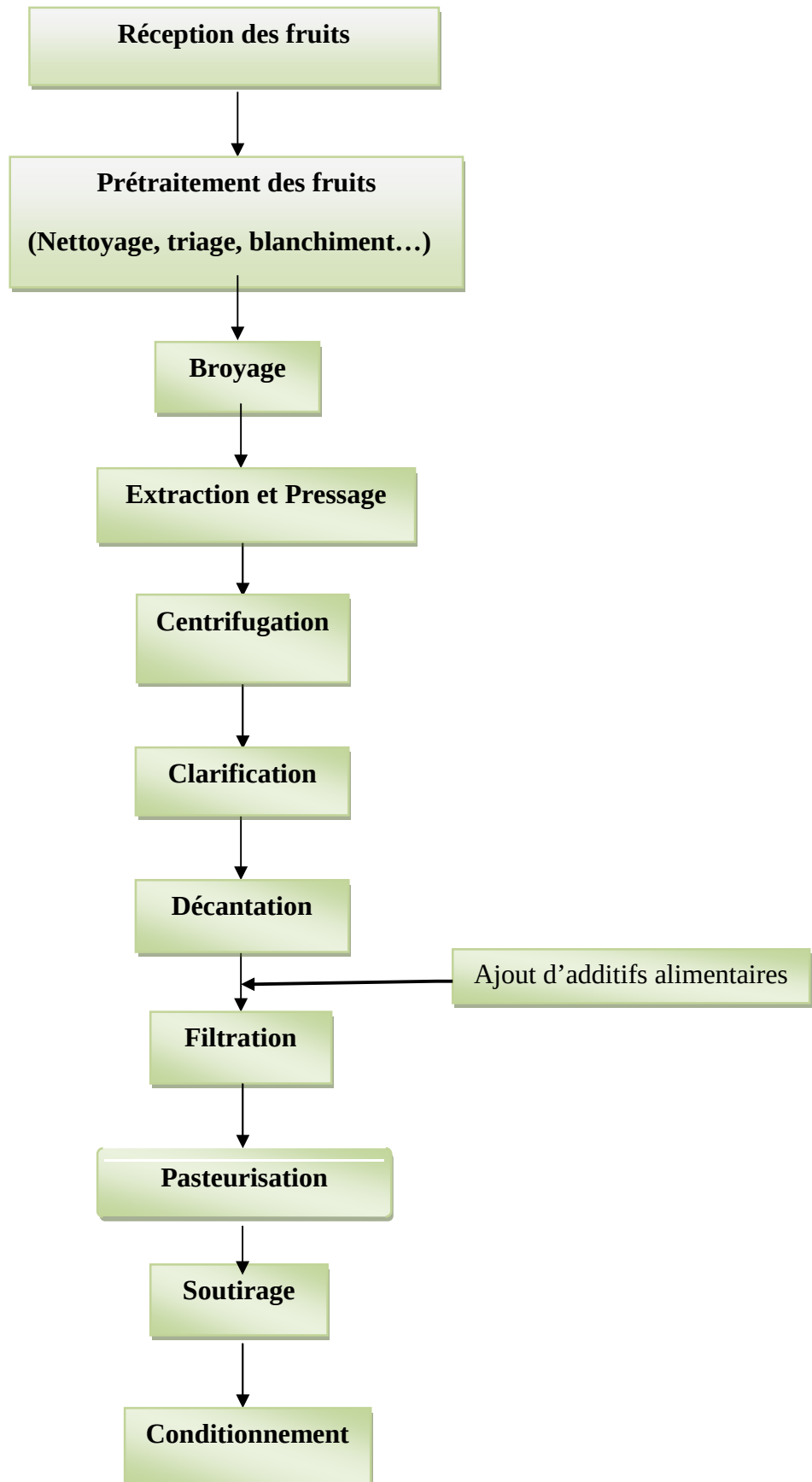


Figure 1 : Etapes générales de la fabrication d'un jus de fruits (ANONYME 5).

❖ Stabilisation des jus de fruits troubles :

Dans les jus troubles, il est nécessaire que le trouble ou l'opalescence reste homogène pour préserver les qualités organoleptiques de ce type de jus. Le trouble est attribué à une suspension de particules composées de pectines, protéines, hémicellulose, cellulose et d'autres composés mineurs. Pour éviter l'apparition de trouble lors du stockage post-fabrication, il est important de procéder à une clarification préalable du moût (**AGUILO-AGUAYO et al, 2010**).

La clarification consiste à éliminer les matières en suspension dans le jus. Cependant, cette clarification comprend plusieurs phases suivies soit par l'action des enzymes pectinolytiques, amylolytiques et protéolytiques, de collage, ou par filtration (**BRAT et CUQ, 2007**).

- **L'enzymation** : est une étape de fabrication réalisée avant filtration afin d'éviter l'apparition du trouble au cours du stockage. Celle-ci vise à dénaturer le réseau pectique et amylasique grâce à l'action d'enzymes en mode d'action spécifique. Cette opération se réalise en ajoutant 0.5 à 2 g/hl d'enzyme dans le moût (les pectines méthylestérases, les polygalacturonases).
- **Le collage** : qui vise à augmenter la taille unitaire des particules en suspension, en les agglomérant ainsi, elles décanteront plus rapidement et seront éliminées plus facilement après floculation par des colles.
- **La filtration** : permet de séparer des éléments solides contenus dans un liquide par l'interposition d'une barrière filtrante appelée medium filtrant. La fabrication des jus clairs par filtration permet de garantir la bonne qualité (**BRAT et CUQ, 2007**).

I.5. La conservation des jus de fruits :

La conservation des jus de fruits comprend un ensemble de procédés dont le but est de conserver les propriétés gustatives, nutritives des denrées alimentaires, ainsi que leur comestibilité. Parmi ces traitements on distingue :

I.5.1. Les traitements thermiques :

I.5.1.1. La conservation par la chaleur :

❖ La pasteurisation :

Selon **VASANTHA RUPASINGH et YU, (2012)**, la pasteurisation est un procédé classique le plus largement utilisé pour la conservation des jus de fruits et boissons. La pasteurisation des jus est basée sur une réduction des microorganismes les plus résistants qui peuvent nuire à la santé publique. Généralement, elle se fait entre +65°C à +95°C durant quelques minutes à quelques secondes, suivie d'un brusque refroidissement.

❖ La lyophilisation ou « Cryodessiccation » :

Cette méthode consiste à la dessiccation d'un jus de fruits préalablement surgelé par sublimation. La vapeur d'eau quitte ensuite le jus et on la capture par congélation à l'aide d'un condenseur, ou piège froid. Cette technique permet de mieux conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du jus traité; car les substances solubles ne se déplacent pas pendant le séchage ce qui lui permet une fois reconstitué de ressembler beaucoup plus au produit d'origine (VIERLING, 2003).

❖ La concentration :

La concentration qui consiste en générale en une évaporation sous vide, permet de faciliter le transport et l'entreposage. Les jus ainsi présentés peuvent être vendus tel quel ou reconstitués à l'usine. C'est une méthode qui permet de réduire les volumes et donc le coût du stockage et du transport (FREDOT, 2012). Souvent après la concentration, le jus subit deux autres opérations :

- **Récupération et réintroduction des composés aromatiques** : en effet, au cours de la concentration il y a eu perte d'aromes. On les récupère par passage de la vapeur dans une colonne de distillation.
- **Redilution avec du jus frais « cut back »** : le jus de départ est d'environ 7 fois plus concentré que le jus final. La redilution les ramène à 5 fois par addition du jus frais.

I.5.1.2. La conservation au froid :

❖ La réfrigération :

Consiste à entreposer le jus à une température basse, proche du point de congélation, mais toujours positive par rapport à celui-ci. Généralement, la température de réfrigération se situe aux alentours de 0°C à +4°C (VIERLING, 2003).

❖ La congélation :

Généralement les jus de fruits sont refroidis rapidement à 0°C puis congelés jusqu'à -18°C. Ce procédé provoque la formation de cristaux de glace, de l'eau contenue dans le jus. On assiste alors à une diminution importante de l'eau disponible, donc une baisse de l'activité de l'eau (A_w), ce qui ralentit ou inhibe l'activité microbienne et enzymatique (VIERLING, 2003).

❖ La pascalisation :

Est un procédé de conservation, que l'on peut considérer comme une pasteurisation à froid, consistant à soumettre le jus à de très fortes pressions de l'ordre de 6000 bars afin d'inhiber les agents pathogènes et ainsi, améliorer la conservation. Ce procédé intervient comme une alternative aux traitements thermiques classiques, notamment pour les produits sensibles à la chaleur (ANONYME 6).

I.5.2. Conservation chimique :

Les additifs alimentaires sont largement utilisés pour la prolongation de la durée de vie des jus de fruits et boissons, cependant plusieurs agents chimiques sont utilisés pour stabiliser les jus. Le tableau (III) montre les avantages d'utilisation de certains additifs dans l'industrie des jus :

Tableau (III) : Avantage d'utilisation d'additifs alimentaires (ANONYME 7).

<i>Additifs alimentaires</i>	<i>Avantages</i>
• <i>Les arômes</i>	Donner une odeur et un grand choix de gout au consommateur.
• <i>Les colorants</i>	Normaliser la couleur d'une boisson, la rendre esthétiquement attirante pour le consommateur, corriger la fluctuation naturelle du couleur.
• <i>Agents conservateurs</i> • <i>E211 : Benzoate de sodium ; acide ascorbique</i> • <i>SO₂</i>	Assurer la sécurité des boissons en éliminant les facteurs biologiques. E211 : prolonge de manière très efficace la durée de vie des boissons en inhibant le développement des levures, moisissures. SO ₂ : agent antimicrobien.
• <i>Edulcorants</i> « <i>aspartame, polyols...</i> »	Limite la consommation des sucres dans le cadre d'un régime minceur. Profite de gout sucré sans perturber la glycémie chez les personnes diabétiques.
• <i>Acidifiants ; acide ascorbique ; acide citrique.</i>	Gout acide, renforcer l'action des antioxydants. Préserve la couleur des boissons.

I.6. Les altérations des jus de fruits :

La qualité des aliments est soumise à des réactions de dégradation durant toutes les étapes impliquées dans leur production à partir du champ jusqu'au consommateur. Les réactions de détériorations observées dans les produits alimentaires, qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptique et nutritionnelle. Par exemple, l'altération des fruits ou légumes lors des traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage, découpe) ou technologiques (conservation au froid, congélation-décongélation, irradiation) ou encore naturels (infection fongique) est engendrée par diverses réactions biochimiques telles que :

I.6.1. Altérations biochimiques :

❖ Brunissement non enzymatique : BNE (Réaction de Maillard) :

Lors de l'entreposage des jus de fruits, le BNE provoque souvent des effets défavorables : perte de la valeur nutritionnelle par destruction des acides aminés essentiels, apparition

d'odeur et de saveur indésirables, assombrissement de la couleur, problèmes digestifs, formation de molécules cancérigènes (CHEROT, 2007).

❖ Brunissement enzymatique (BE) :

C'est un processus naturel rendant bruns certains aliments en particulier ceux d'origine végétale. Le brunissement enzymatique peut être volontaire comme il peut être involontaire dans le cas où il modifie l'apparence et la qualité nutritionnelle des jus de fruits (perte de vitamines, la toxicité de l'aliment...). Il engendre des changements au niveau de la saveur et le goût (amertume, rance...) (MACHEIX *et al*, 2005).

I.6.2. Altérations microbiologiques :

❖ Les jus et les boissons de fruits, du fait de leur teneur en eau et de leur richesse en nutriments, constituent des milieux propices à la prolifération d'un grand nombre de microbes. En effet, les germes présents dans les jus de fruits proviennent en grande partie de la matière première. La flore microbienne susceptible de se croître dans les jus de fruits est restreinte aux levures, aux moisissures et certaines bactéries lactiques (figure 2); ce qui conduit à la fermentation des sucres entraînant l'apparition de goût et d'odeurs indésirables et le cas échéant de gaz ainsi qu'une apparition de troubles et de flocons (LECLERC *et al*, 1977).



Figure (2) : Altération d'un jus de fruits (ANONYME 8, 2014).

Chapitre II :
***Les conservateurs
alimentaires***

II.1. Définition et caractéristiques des additifs alimentaires :

II.1.1. Définition :

Selon la directive **89/107/CE** du conseil du 21 Décembre 1988 «*On entend par additif alimentaire toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires dans un but technologique au stade de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage, a pour effet, ou peut raisonnablement être estimée avoir pour effet qu'elle devient elle-même, ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires* ».

II.1.2. Origine des additifs alimentaires :

Généralement, les additifs alimentaires peuvent avoir plusieurs origines :

➤ **Les additifs naturels** : ce sont des additifs provenant de substances naturelles et ne sont pas sans risque pour la santé. Il s'agit de produits issus du monde minéral, les extraits des produits végétaux (chlorophylles, farine de graines de caroube, de tamarin,...etc.) ou extraits animaux (carmin de cochenille, cire d'abeille etc....) ;

➤ **Les additifs synthétiques** : ils sont totalement artificiels ou identiques à des substances naturelles. Ils peuvent être dangereux, car leur fabrication exige souvent l'utilisation de solvants qui ne sont pas entièrement éliminés ;

➤ **Les additifs artificiels** : il s'agit d'additifs qui n'existent pas dans la nature et qui doivent être fabriqués (**WHO, 2012**).

II.1.3. Classification et la numérotation des additifs alimentaires :

La classification catégorielle des additifs alimentaires, selon l'annexe I de la directive-cadre CE du 21 décembre 1988, regroupe ces additifs en fonction de leurs propriétés fonctionnelles, en 24 classes (**Tableau IV**). Actuellement, plus de 350 additifs alimentaires sont autorisés en Europe.

Tableau (IV): Liste des additifs alimentaires selon la directive CE n°89/107 du 21décembre 1988

01	Colorant	13	Amidon modifié
02	Conservateur	14	Edulcorant
03	Antioxydant	15	Poudre à lever
04	Emulsifiant	16	Agents moussant et anti-moussant
05	Sel de fonte	17	Agent d'enrobage (et de glisse)
06	Epaississant	18	Agent de traitement de la farine
07	Gélifiant	19	Affermissant
08	Stabilisant	20	Humectant
09	Exhausteur de gout	21	Séquestrant
10	Acidifiant	22	Enzyme
11	Correcteur d'acidité (et de pH)	23	Agent de charge
12	Antiagglomérant	24	Gaz propulseur et gaz d'emballage

Chapitre II : Les conservateurs alimentaires

En ce qui concerne la numérotation, les additifs ont fait l'objet d'une codification de la communauté européenne d'où le symbole « E » qui désigne « Europe » est suivi de 03 ou 04 chiffres selon leur rôle : E1XX pour les colorants, E2XX pour les conservateurs, E3XX pour les antioxydants...etc. (Tableau V) (ANDRE, 2013).

Tableau (V) : Numérotation des additifs alimentaires (VIERLING, 2005).

<i>Additifs :</i>	<i>Code par la CE :</i>	<i>Additifs :</i>	<i>Code par la CE :</i>
*Colorants	E100 à E180	*Antiagglomérants	E500 à E553
*Conservateurs	E200 à E285	*Exhausteurs du gout	E620 à E650
*Antioxydants	E300 à E321	*Agents d'enrobage	E900 à E914
*Acidifiants et correcteurs d'acidité	E325 à E380	*Gaz d'emballage/gaz propulseurs	E938 à E949
		*Edulcorants	E950 à E968
		*Enzymes alimentaires	E1100 à E1105
*Emulsifiants	E400 à E495	*Amidons modifiés	E1404 à E1451
*Epaississants			
*Gélifiants			
*Stabilisants			

Selon le codex, on utilise le système international de numérotation : **SIN ou INS** (*International Numbering System*). Dans ce système, les numéros ne sont pas précédés des lettres E réservées à la CEE (ESCARGUEIL, 2009).

Exemple :

	Cadre du Codex alimentarius :	Cadre de la CEE :
Les conservateurs :	SIN 200	E 200

En fonction du but qui leur est assigné, on peut classer les additifs alimentaires en ces différents groupes :

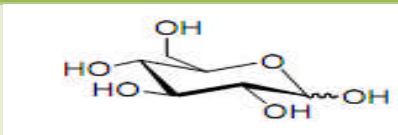
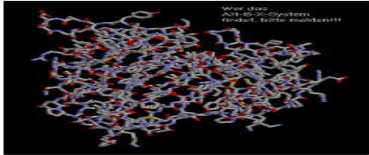
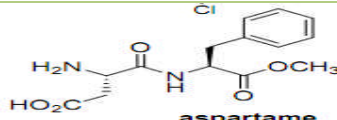
II.1.3.1. Additifs alimentaires modifiants le gout :

➤ **Edulcorant** : est une substance ayant un goût sucré, non ou faiblement calorique, utilisée pour donner une saveur sucrée aux denrées alimentaires. Ils peuvent être d'origine naturelle issue des plantes (les fruits et les légumes) ou synthétisés chimiquement (BECKER et al, 2009).

Chapitre II : Les conservateurs alimentaires

Les édulcorants sont classés en deux familles : les polyols ou édulcorants de masse dont le pouvoir sucrant (PS) est proche du saccharose (sucre de table) et les édulcorants intenses de PS de 2000 à 3000 fois supérieur à celui du saccharose. (**Tableau VI**).

Tableau (VI) : Quelques exemples d'édulcorants et leurs structures :

Nature	Edulcorants	Structure
Edulcorant naturel (polyol)	sorbitol E420	
Edulcorant intense (naturel)	Thaumatococine E957	
Edulcorant intense (synthétique)	Aspartame E951	

➤ **Les exhausteurs de gout (E600) :** ce sont des agents de sapidité qui excitent la réceptivité des cellules gustatives, ils sont introduits pour renforcer le gout et/l'odeur d'une alimentation (**BECKER et al, 2009**).

Exemples de quelques exhausteurs de gout :

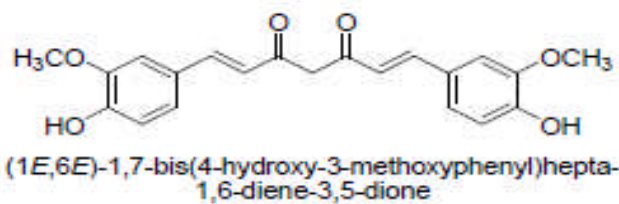
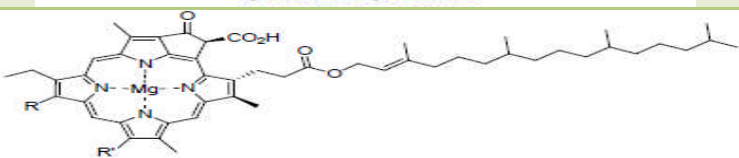
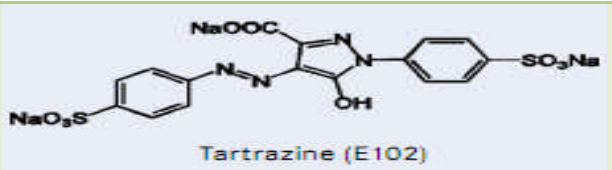
E 626 : Acide guanylique

E 501 : Carbonate de potassium

II.1.3.2. Additifs alimentaires modifiants la couleur :

➤ **Les colorants :** Les additifs qui ajoutent ou redonnent de la couleur à des denrées alimentaires. Les colorants employés pour l'alimentation sont généralement d'origine naturelle (végétale, sauf le rouge de Cochenille qui est d'origine animal extrait d'insectes *Coccus cacti*), comme ils peuvent être synthétiques, issus par voie chimique des molécules naturelles ou très voisines. (**Tableau VII**) (**VAN DE WEGHE, 2012**).

Tableau (VII) : Quelques colorants utilisés en industries agro-alimentaires et leurs structures :

Les colorants	Structure
- Les colorants naturels *Curcumine (E100)	 (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione
Les chlorophylles (E140i)	
- Colorants synthétiques *Tartrazine (E102)	 Tartrazine (E102)

II.1.3.3. Additifs alimentaires modifiants la texture (E400) :

➤ **Les stabilisants** : Ce sont des substances qui permettent de maintenir l'état physico-chimique d'une denrée alimentaire (MULTON, 2009).

Exemples : E 420 : Sorbitol ; E 422 : Glycérol

➤ **Les épaississants** : ce sont des substances ajoutées à une denrée alimentaire, afin d'augmenter leur viscosité

➤ **Gélifiants** : les substances qui ajoutées à une denrée alimentaire, lui confèrent de la consistance par la formation d'un gèle (ESCARGUIL, 2009).

Les principaux épaississants et gélifiants utilisés en industrie agro-alimentaire :

E 401 : Alginate de sodium ; E 406 : Agar-agar ; E 410 : Farine de graine de Caroube

➤ **Les émulsifiants** : les substances qui, ajoutées à des denrées alimentaires permettent de réaliser ou de maintenir le mélange homogène de deux ou plusieurs phases non miscibles telles que l'huile et l'eau (VIERLING, 2005).

Certains émulsifiants et leurs numérotation :

E 322 : Lécithine ; E 473 : Sucreoester ; E 474 : Sucroglycérides.

II.1.3.4. Les additifs alimentaires assurant la conservation :

➤ **Les conservateurs (E200)** : Les substances qui prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations dues aux micro-organismes (BRANGER *et al*, 2007).

Exemples de quelques conservateurs alimentaires :

E 200 : Acide sorbique ; E 210 : Acide benzoïque ; E 220 : Anhydride sulfureux

➤ **Les antioxydants (E300) :** Les substances qui prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation (telles que le rancissement des matières grasses ou les modifications de couleurs) (AOUFI, 2009). Exemples d'antioxydants : E 300 : Acide ascorbique ; E 306 : Extrait riche en tocophérols ;

II.1.4. Rôle des additifs alimentaires:

- **Rôle économique :** afin de prévenir les détériorations des aliments ou de faciliter et /ou de prolonger le transport (MARTIN, 2001).
- **Rôle technologique :** les objectifs de l'industrie Agro-alimentaire vise à:
 - * accessibilité dans la diversité, ou la mise à disposition du produit quel que soit le lieu et, dans une certaine mesure, la saison ;
 - * la commodité, ou la facilité de la mise en œuvre des produits ;
 - * une qualité régulière pour un cout raisonnable ;
 - * Elaboration et développement de nouveaux aliments (PAI) (BERGER, 2009).
- **Rôle nutritionnel :** l'introduction des additifs dans le but de préserver et d'améliorer le statut des produits alimentaires en fournissant de hautes qualités aux denrées alimentaires c.à.d. visant à remplacer les nutriments perdus pendant la production, ou de compléter les aliments par des nutriments afin d'améliorer leur qualités (CECCONI, 2012).
 - **Rôle d'améliorer ou de maintenir la qualité organoleptique :** le monde des additifs est aujourd'hui considéré comme des denrées très précieuses et onéreuses permettant de maintenir ou améliorer les qualités sensorielles des aliments : la consistance, la texture, la couleur...etc., (MOHAMED *et al*, 2012).
 - **Rôle hygiénique ou sanitaire :** l'amélioration de la conservation des aliments se fait généralement par l'emploi des conservateurs et antioxydants qui sont très importants pour empêcher la prolifération des bactéries ou des moisissures qui peuvent être à l'origine de la contamination par des substances toxiques et même cancérigènes (BAKIRI *et M'ZALI*, 2013).

II.1.5. Réglementation des additifs alimentaires :

La réglementation repose sur le principe des listes positives c'est-à-dire que toute substance non autorisée est interdite. L'autorisation d'un additif alimentaire est soumise à trois conditions essentielles sont :

- il doit faire preuve de son innocuité ;
- il doit justifier de son utilité, celle-ci étant appréciée au regard des solutions dont dispose déjà les utilisateurs ;
- son emploi ne doit pas induire le consommateur en erreur.

Chapitre II : Les conservateurs alimentaires

Conformément aux critères généraux pour l'utilisation des additifs (**définis en annexe II de la directive-cadre**), seuls ont été retenus par les directives susvisées, les additifs évalués par le Comité scientifique de l'alimentation humaine (**CSAH**), ou à partir de 2003, par l'autorité européenne de sécurité des aliments (**AESA**), leur niveau d'utilisation ayant été déterminé sur la base des autorisations d'emploi accordées par les Etats membres.

L'inscription sur la liste positive ne sera autorisée que dans la mesure où l'exposition du consommateur sera toujours inférieure à la DJA. L'additif alimentaire sera ensuite employé dans des conditions précisées par produit ou par dose, tenant compte de la dose journalière admissible (DJA) et des apports faits par l'ensemble des aliments. Dans la mesure où les additifs alimentaires sont régis par des directives européennes, les autorisations d'emplois sont données au niveau communautaire (**ESCARGUEIL, 2009**).

❖ notion de la dose journalière admissible (DJA) :

La DJA est une estimation effectuée par le **JECFA** « *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* », c'est la quantité qu'un individu peut consommer tous les jours de sa vie sans courir de risque pour sa santé. Elle est déterminée à partir de la Dose Sans Effet toxique (DES) chez l'animal le plus sensible, affectée de deux facteurs de sécurité : l'un interspécifique (10) et l'autre intraspécifique (10). Elle sera donc égale à la dose sans effet chez l'animal le plus sensible divisée par 100 et sera exprimé en mg/kg poids corporel/j. Le tableau (**VIII**) montre quelques additifs alimentaires et leurs DJA :

Tableau (VIII) : Représentation de quelques additifs alimentaires et leurs DJA (DE REYNAL et MULTON, 2009).

	<i>Additif alimentaire</i>	<i>Doses journalières admissibles (DJA) (mg/kg de poids corporel/j)</i>
<i>Conservateurs</i>	Acide sorbique	0 – 25
	Les sorbate de Na, Ca, K	0 – 25
	Acide benzoïque	0 – 5
	Acide p -hydroxybenzoïque	0 – 10
<i>Antioxydants</i>	Acide ascorbique et sel E300 à E 304	N S
	Tocophérols E306 à E309	N S
	Gallates E 310 à E 312	0 – 0.5
<i>colorants</i>	Curcumine E100	N S
	Tartrazine E102	0 – 7.5
	Bleu patenté V E129	0 – 15
<i>Edulcorants</i>	Saccharine E954	0 – 2.5
	Aspartame E951	0 – 40

N S : DJA non spécifiée ; **mg/kg pc/j** : mg par Kilogramme de poids corporel par jour.

II.2. Les conservateurs alimentaires :

Ce sont des substances qui possèdent ou pas une valeur nutritive, utilisées pour leurs fonctionnalités dans certains aliments fragiles pour assurer leur stabilité microbiologique (**LONGET, 2013**). Certains sont connus depuis des siècles comme l'acide acétique (vinaigre) ou le nitrate de potassium (salpêtre). Les conservateurs aident à préserver nos denrées sans en modifier les qualités gustatives ou nutritionnelles. Ils sont particulièrement utiles dans les produits à base de fruits ou légumes, de charcuterie ou de poisson (**ANONYME 9**).

II.2.1. Types de conservateurs alimentaires :

Il existe deux types de conservateurs : les minéraux et les organiques (**Tableau IX**).

➤ Les conservateurs minéraux :

* **Les chlorures et les phosphates** : en raison de leur usage traditionnel, les chlorures et les phosphates ne sont pas considérés comme additifs dans l'esprit du grand public. Ils sont utilisés comme dépresseurs de l'activité de l'eau (séchage complet ou partiel). Les phosphates sont employés dans les produits de charcuterie et contribuent à leur texture et à la rétention d'eau. Les phosphates interviennent aussi comme agents antimicrobiens. H_3PO_4 (E238), Na_3PO_4 (E239), K_3PO_4 (E240) sont les formes les plus courantes des phosphates ; la dose autorisée est de 1 à 5 g/kg pour les produits de consommation courante (**BEDOUX, 2014**).

* **Les nitrites et les nitrates** : NaNO_3 (E251 : nitrate de sodium), NaNO_2 (E250 : nitrite de sodium), KNO_3 (E252 : nitrate de potassium) et KNO_2 (E249 : nitrite de potassium). Ils sont utilisés traditionnellement dans les produits de charcuterie. Le composé véritablement actif est le nitrite. Sous l'effet de la flore, les nitrates sont réduits en nitrites.

* **Anhydride sulfureux et sulfites** : Ces additifs sont utilisés en œnologie. L'espèce active est l'anhydride sulfureux qui se dégage dans les aliments par réaction de sels sulfités avec l'eau. Il est actif sur les bactéries, moisissures et levures. Il inhibe les phénomènes du brunissement enzymatique et du brunissement non enzymatique (réaction de Maillard).

* **Anhydride carbonique (E290)** : Le dioxyde de carbone (CO_2) inhibe la croissance de nombreux micro-organismes. Actif contre les moisissures mais peu contre les levures et aucune action contre les bactéries. Il est principalement utilisé pour la conservation de viande réfrigérée, œufs, lait, poissons et produits de la mer. Egalement, employés dans les boissons gazeuses (**FRAZIER et WESTHOFF, 1988**).

➤ Les conservateurs organiques :

• A effet primaire :

* **Acide sorbique et sorbates** : l'acide sorbique et ses sels possèdent une activité antimicrobienne. Il est surtout employé sous forme de sorbate de potassium pour la conservation du pain tranché, des laits fermentés, des yaourts, de la mayonnaise, en confiserie et les fruits confis et dans les préparations aux fruits.

* **Acide benzoïque et benzoates** : L'acide benzoïque (E210) peut être obtenu soit par extraction de baies, soit par synthèse. Il est également disponible sous trois formes de sels : benzoate de sodium (E211), benzoate de potassium (E212), benzoate de calcium (E213) (LUCK et JAGER, 1997).

* **Esters de l'acide parahydroxybenzoïque ou parabènes** : ces agents de conservation agissent contre les moisissures et les bactéries. Ils sont utilisés en petites quantités et dans des aliments de consommation limitée (COOPER et BARRETT, 2007).

* **Acide acétique (E260) et sels (E261) et (E263), acide formique (E236) et sels (E237) et (E238), acide propionique (E280) et sels (E281) et (E283)** :

Ont un rôle acidifiant, empêchant le développement de certains micro-organismes. En surface, ils sont employés comme décontaminant des viandes. Les doses d'utilisation étant très faibles, ils sont toujours associés à d'autres moyens de conservation.

Utilisations principales : pain, bière, fruits et légumes en conserve, jus de fruits, confitures (EFSA JOURNAL, 2004).

• A effet secondaire :

*Acide citrique (E330) ;

*Acide tartrique (E334) ;

*Acide lactique (E170) ;

*Acide ascorbique (E300) 'souvent classé dans les antioxygènes'

Ce groupe est appelé agents conservateurs secondaires ayant d'autres fonctions :

L'acide citrique est l'acide organique le plus utilisé dans l'industrie alimentaire (75% des acidifiants alimentaires en Europe!). Abaisant le pH jusqu'à pH 2.9, il inhibe le développement des levures et des micro-organismes. Les principales utilisations (au-delà de son action antioxydante) sont les boissons sucrées plates ou gazéifiées (« soft drink »), en confiserie et confitures (il rehausse les arômes de fruits) (COM, 2004).

Tableau (IX) : Les principaux conservateurs autorisés et leurs natures (CHOFFAT, 2014).

<i>Origine</i>	<i>Conservateurs</i>	<i>Code CE</i>
<i>Conservateurs minéraux</i>	Anhydride sulfureux	E220
	Sulfite de sodium	E221
	Phosphate de sodium	E239
	Nitrite de potassium	E249
	Nitrate de sodium	E251
	Nitrate de potassium	E252
	Anhydride carbonique	E290
<i>Conservateurs organiques</i>	Para-hydroxybenzoate d'heptyle	E209
	Para-hydroxybenzoate d'éthyle	E214
	Para-hydroxybenzoate de propyle	E216
	Para-hydroxybenzoate de méthyle	E218
	Para-hydroxybenzoate de méthyle sodique	E219
	Acide benzoïque	E210
	Acide formique	E236

II.2.2. Acide benzoïque, ses dérivés et leurs caractéristiques :

Analogue de l'acide hippurique et isolé en 1832, l'acide benzoïque (E210) est un acide formique phényle qui appartient au groupe des acides organiques faibles (**MORO BURONZO, 2012**). Il est peut être obtenu soit par extraction de baies (type de fruit charnu), soit par synthèse chimique. Il est également disponible sous trois formes de sels : benzoate de sodium (E211), benzoate de potassium (E212), benzoate de calcium (E213) (**BOSUND, 2013**).

➤ Propriétés :

Il est actif sous forme non ionisé à $\text{pH} < 4$, en inhibant les bactéries. Il appartient au groupe des acides organiques non dissociés. Il exerce un effet bactériostatique. Il est peu soluble contrairement aux benzoates. Il existe à l'état naturel dans différents types de fruits (**PÖLÖNEN et al, 2012**). La figure (3) montre la structure générale de l'acide benzoïque :

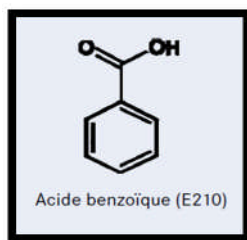


Figure (3) : Structure générale de l'acide benzoïque.

II.2.2.1. Le benzoate de sodium :

Le benzoate de sodium est retrouvé dans de nombreux produits alimentaires comme conservateur mais il est également utilisé comme antiseptique dans certains médicaments et employé dans plusieurs produits cosmétiques.

Il s'agit du sel de sodium de l'acide benzoïque qui a pour formule C_6H_5COOH . Le benzoate de sodium est une base faible. Il est soluble dans l'eau et l'alcool. Une fois dissout, il produit de l'acide benzoïque, soit par précipitation en présence d'acides forts comme l'acide sulfurique, soit il est produit par la neutralisation de l'acide benzoïque avec de l'hydroxyde de sodium. Le benzoate de sodium est commercialisé sous forme de poudre cristalline ou de granulés (PARKE et LEWIS, 2012). La figure (4) montre la formule générale du benzoate de sodium :

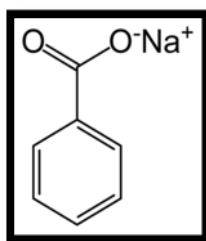


Figure (4) : Formule générale du benzoate de sodium (E211).

Le benzoate de sodium est très soluble dans l'eau (au contraire de l'acide benzoïque), il est principalement obtenu par synthèse chimique.

Il est retrouvé naturellement dans certains fruits comme les airelles, les canneberges, la cannelle, les pruneaux, les clous de girofle (ANONYME 10).

II.2.2.2. Les parabènes :

Selon VALKOVA et al (2001), Les esters de l'acide 4- parahydroxybenzoïque également appelés parabènes, sont largement utilisés comme agents antimicrobiens dans une grande variété de produits alimentaires, pharmaceutiques et produits cosmétiques. Ils sont stables, efficaces sur une large gamme de pH, et actifs contre un large spectre de micro-organismes (BEVERIDGE et HART, 2013). Toutefois, leur mode d'action n'est pas bien compris.

Ils sont postulés pour agir en perturbant les processus de transport de la membrane ou en inhibant la synthèse de l'ADN, de l'ARN ou de certains enzymes clés, tels que les ATP_{ases} phosphotransférase chez certaines espèces bactériennes (**HAAG et LONCRINI, 1984**).

Bien que l'on parle souvent de parabène au singulier, il existe différents composés dans cette famille qui diffèrent par la nature du groupe alkyle R.

Les plus couramment utilisés sont :

- le méthyl parabène, ou 4-hydroxybenzoate de méthyl (E218), et son sel de sodium (E219) ;
- l'éthyl parabène, ou 4-hydroxybenzoate d'éthyl (E214), et son sel de sodium (E215) ;
- le propyl parabène, ou 4-hydroxybenzoate de propyl (E216), et son sel de sodium (E217) ;
- l'isopropyl parabène ;
- le butyl parabène ; l'isobutyl parabène ;
- le benzyl parabène.

La structure générale d'un parabène est donnée par la figure (5) :

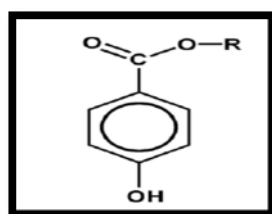


Figure (5) : Structure générale d'un parabène.

Les parabènes se trouvent aussi à l'état naturel dans certains aliments tels que la mure, l'orge, la fraise, le cassis, la vanille, la carotte et l'oignon (**ANDRE, 2014**).

II.2.3. Mode d'action du benzoate de sodium et du méthyl parabène :

C'est un groupe de conservateurs très important qui inhibent la croissance des bactéries et des champignons et ont aussi une action sur la germination des spores bactériennes. Ils doivent leurs effets bactériostatiques à leur fonction acide faible ainsi qu'à des propriétés spécifiques de leurs molécules (**BRANEN, 2002**). Ils peuvent induire 2 types d'effets :

➤ **La modification du pH :** Ils participent en effet à l'acidification du milieu. La membrane cellulaire est imperméable aux acides hydrophiles ionisés, et donc aux ions H^+ qui saturent cependant les perméases cationiques et diminuent ainsi la perméabilité membranaire des cations. Le pH interne (pHi) des micro-organismes est tout de même modifié par les variations du pH externe (pHe). *Escherichia coli* par exemple subit une baisse de pHi de 7.73 à 6.75 quand le pHe passe de 7.0 à 5.0.

Salmonella typhimurium y est moins sensible, et pour la même baisse de pHe, le pHi passe de 7.62 à 7.03. *S. typhimurium* conserve par ailleurs un meilleur taux de croissance qu'*E. coli*. L'effet de la baisse de pHi chez ces deux germes s'accompagne aussi d'une diminution du volume cellulaire et d'une perte de potassium.

➤ **La dissociation des molécules d'acides faibles en fonction du pH du milieu :**

C'est la forme non dissociée de ces acides qui est active contre les micro-organismes. Contrairement aux ions H^+ , les molécules non dissociées diffusent passivement dans le milieu intracellulaire dont elles modifient ensuite le pHi en libérant des ions H^+ . Ce phénomène est accentué car le pHi est plus basique que le pHe, ce qui favorise l'ionisation des molécules d'acides faibles. En effet, comme on peut le voir dans le tableau (X), la proportion d'acide non dissocié augmente avec la baisse du pH, et donc pour être actifs, la plupart des conservateurs doit se trouver à des pH acides et la limite maximum d'efficacité est comprise entre pH=5 et pH=6 suivant les molécules. Les esters de l'acide para-hydroxybenzoïque font exception et on pourra donc les utiliser à pH neutre (DE REYNAL *et* MULTON, 2009).

Tableau (X) : Pourcentage d'acide non dissocié à différents pH (DE REYNAL *et* MULTON, 2009).

Acides organiques	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7
acétique	98.5	84.5	34.9	5.1	0.54
benzoïque	93.5	59.3	12.8	1.44	0.14
citrique	53	18.9	0.41	0.006	0.001
lactique	86.6	39.2	6.1	0.64	0.06
Parabènes	99.9	99.9	99.9	99.7	96.7
Propionique	98.5	87.6	41.7	6.67	0.71
Sorbique	97.4	82	30	4.1	0.48
Nitrite	—	—	2.5	0.25	0.03

La modification de l'équilibre homéostatique du cytoplasme par la pénétration des acides faibles peut entraîner des altérations et même des ruptures de la membrane plasmique, ce qui peut avoir des conséquences graves sur la croissance et la viabilité des cellules. Par ailleurs, les réactions enzymatiques ont un pH optimum en-deçà et au-delà duquel la cinétique est perturbée. Toute variation du pH cytoplasmique va donc entraîner un ralentissement de l'activité enzymatique et de la croissance, et perturber les grandes voies métaboliques (CHIRCHESTER *et* TANNER, 2013).

II.2.4. Utilisation des conservateurs alimentaires :

II.2.4.1. Benzoate de sodium :

Selon les conditions d'hydrophilie et de pH, ces additifs ont des spectres d'action sur diverses classes de micro-organismes et donc des emplois justifiés et précis.

En effet, l'acide benzoïque et ses sels 'benzoate de sodium' sont souvent employés dans des boissons aromatisées sans alcools, crevettes cuites, confitures, gelées, marmelades à faibles teneur en sucre ainsi que les produits similaires à valeur énergétique réduite ou sans sucre et autres pâtes à tartiner à base de fruits.

Dans certains cas, ils sont utilisés pour la conservation des laits fermentés et des yaourts (**QUATTRUCCI et MASCI, 1992**).

Le benzoate de sodium est également retrouvé dans certains médicaments comme les trophires pour les nourrissons. Il est généralement le principal agent actif du médicament. On le retrouve aussi dans quelques produits cosmétiques comme les gels douches et les shampoings. C'est l'un des rares conservateurs autorisés avec la vitamine E.

Pouvant présenter quelques problèmes de toxicité, la dose maximale est de 150 mg/L exprimée en acide benzoïque (**ANONYME 11, 2013**).

II.2.4.2. Les parabènes :

Leur utilisation principale est donc liée à leur activité effective antibactérienne et antimycosique.

Les parabènes les plus rencontrés sont le méthyl parabène et le propyl parabène. Ils sont largement utilisés dans les produits cosmétiques ; on estime que plus de 80 % des produits de beauté en contiennent, notamment les shampoings, les crèmes hydratantes, les mousses à raser et les gels nettoyants (**RASTOGI et al, 1995**).

Dans le domaine agro-alimentaire, sont utilisés pour la préparation des :

- Produits d'imitation du chocolat et succédanés de chocolat (confiserie) ;
- Amuse-gueules à base de pommes de terre, de céréales, de farine ou d'amidon (extraits de racines et de tubercules, de légumes secs) ;
- Dans l'enrobage de gelée pour produits à base de viande (cuite, saumurée ou séchée) ;
- La fabrication du pâté ;
- Traitement en surface des produits de viande séchés (**ANONYME 12**).

II.2.5. Méthodes de dosages des additifs alimentaires :

II.2.5.1. Les techniques chromatographiques :

Il existe un grand nombre de possibilités de dosage des additifs alimentaires, faisant appel aux techniques chromatographiques, car elles sont à la fois des techniques d'extraction, de séparation et de dosage (**CLEMENT, 2005**) ; parmi les plus utilisées, on distingue :

❖ *La chromatographie sur couche mince (CCM) :*

La chromatographie sur couche mince (CCM) est un procédé de partage multi-étapes qui repose principalement sur des phénomènes d'adsorption (**SKONG et WEST, 2006**). C'est

une technique simple pour séparer les différents constituants d'un mélange, elle est principalement utilisée pour l'extraction et le dosage des colorants alimentaires (RANDERATH, 2012).

❖ *La chromatographie en phase gazeuse (CPG) :*

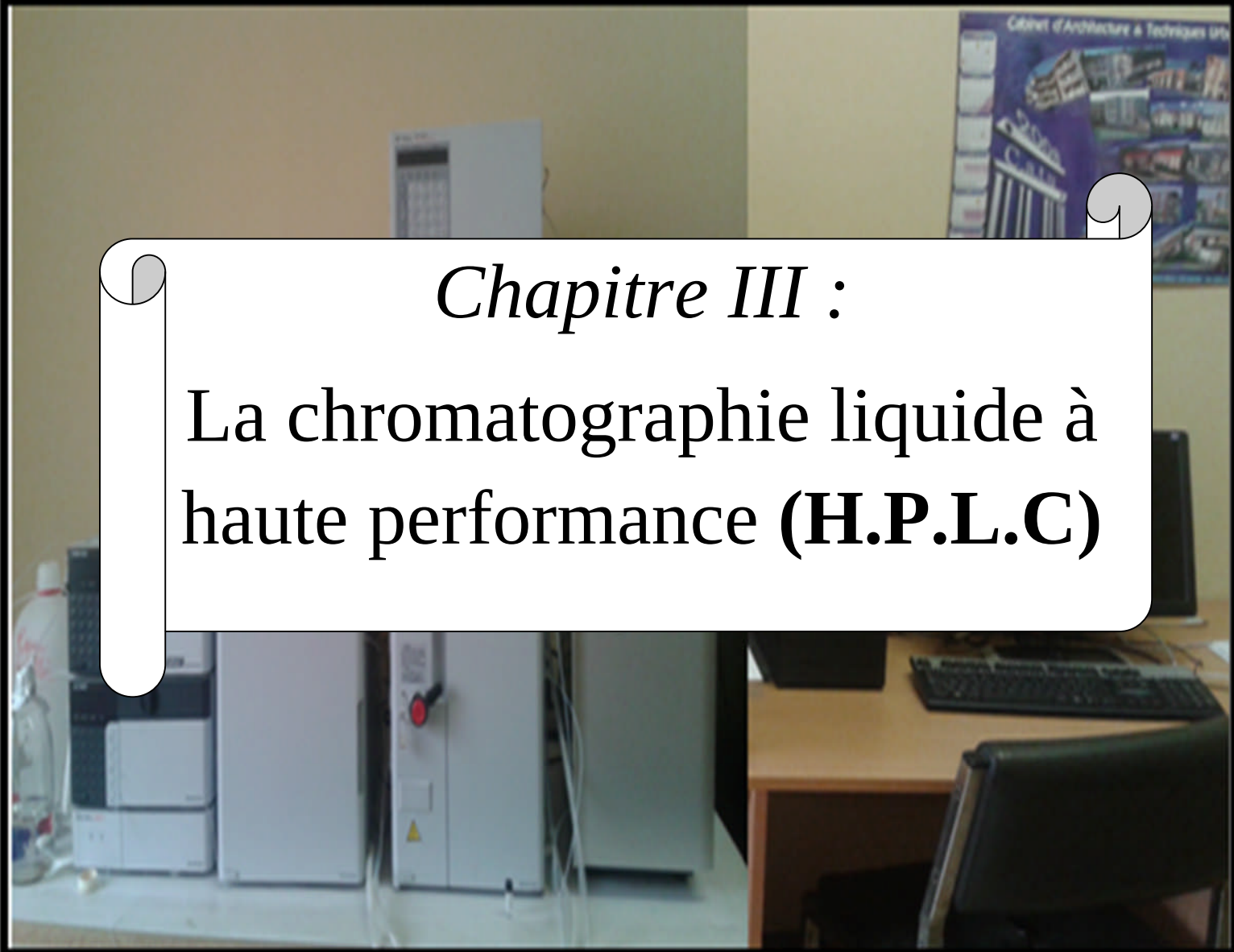
La CPG est un cas particulier de chromatographie de partage utilisable pour analyser des petites molécules volatiles ou devenant volatiles par une transformation chimique préalable (dérivatization) (SKOOG *et al*, 2003). Elle peut être utilisée pour le dosage des colorants et les édulcorants alimentaires.

❖ *La chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C) :*

Cette méthode permet de séparer des composés de masse molaire variable, de natures chimiques différentes et même des isomères. Elle est devenue la 1^{ère} technique analytique présente dans les laboratoires de recherche et d'analyses. Elle couvre tous les domaines d'application. Elle est généralement utilisée pour le dosage des conservateurs et antioxydants. Elle est préférée à la CPG pour des raisons liées à la sensibilité des antioxydants à la température (LAFONT, 2013).

Chapitre III :

La chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C)



Chapitre III : La Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C)

III.1. Généralités et définition de la chromatographie liquide à haute performance:

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation (**JACOB, 2011**).

La Chromatographie Liquide à Haute Performance, est apparue en 1968. Il s'agit, en réalité, d'une amélioration des méthodes chromatographiques liquides sur colonne (**ROSSET, 1991**). Son succès réside principalement dans la qualité granulométrique de la phase stationnaire. En effet, la mise au point de phase stationnaire de granulométrie plus fine et homogène a ainsi permis d'améliorer considérablement l'efficacité de la chromatographie (**KAMOUN, 1997**).

Son atout majeur d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne (qui contient la phase stationnaire) et de la composition de l'éluant (phase mobile) en exploitant donc les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire, explique son utilisation massive (**NOLLET, 2000**).

III.2. Principe de la chromatographie liquide à haute performance:

La chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) est une technique de séparation, d'identification et de quantification des constituants d'un mélange basée sur des phénomènes d'adsorption ou de partage entre une phase mobile de nature liquide formée d'un ou plusieurs solvants miscibles, qui est stockée dans des réservoirs appelés réservoirs d'éluant et poussée par une pompe sous haute pression, et une phase stationnaire de nature liquide ou solide le plus souvent l'alumine ou de la silice, de granulométrie fine et régulière qui remplit la colonne chromatographique.

Chaque soluté injecté sur la colonne est soumis à deux effets antagonistes :

- un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble ;
- un effet de rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit (**MECHRI, 2011**).

La séparation et le temps de migration des composés à séparer dépendent des différences d'affinités de ces composés pour les phases mobiles et stationnaires.

III.3. Les supports de la chromatographie liquide à haute performance :

Les supports sont des solides très finement divisés dont la principale propriété est d'être inerte vis-à-vis des phases stationnaire et mobile. Il est nécessaire que leurs rétention soit énergétique et qu'ils ne réagissent pas avec le soluté.

Le support majoritairement utilisé est le gel de silice formé de grains de diamètre variant de 1,5 à quelques dizaines de micromètres. Ces grains présentent à leur surface des pores de diamètres différents (80 à 300 μm) au travers desquels la phase mobile circule (**CHIMA, 2000**).

Chapitre III : La Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C)

Les phases stationnaires : les phases stationnaires majoritaires sont des phases greffées c.à.d. des phases dans lesquelles de véritables liaisons chimiques existent entre elles et le support. Les plus utilisées sont constituées de chaînes aliphatiques greffées, de polarité ou de longueur variables (SMAOUI, 2010). En chromatographie de partage, méthode la plus rencontrée, on distingue deux types de phase stationnaire :

- ❖ **La phase stationnaire normale (phase minoritaire) :** phase polaire qui nécessite alors l'utilisation d'une phase mobile peu polaire (hydrocarbures, par exemple) ;
- ❖ **La phase stationnaire inverse (la plus utilisée) :** phase non polaire, qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile plutôt polaire (mélange eau/méthanol, eau/acétonitrile, eau/tétrahydrofurane, tampon/solvants organiques) (PENCHEV, 2010).

Les phases mobiles :

Elles doivent présenter les propriétés suivantes :

- ✓ posséder un pouvoir solvant et une inertie chimique vis-à-vis des composés à séparer ;
- ✓ posséder également une inertie chimique et une insolubilité vis-à-vis de la phase stationnaire.

Le plus souvent, ces phases mobiles sont constituées de plusieurs solvants : mélanges d'eau ou de solutions tamponnées avec un solvant organique dont les proportions peuvent varier ou non au cours de l'analyse. C'est pourquoi le choix de la phase mobile dépend surtout de :

- ✓ la nature des composés à analyser ;
- ✓ la polarité de la phase stationnaire utilisée (SINE, 2008).

Selon CHAVANNE et BEAUDOIN, 2006 ; Les solvants utilisés peuvent être classés selon leurs propriétés physiques. Il s'agit principalement de :

- **leur polarité ou coefficient de polarité :** cette grandeur, sans dimension, comprise entre 0 et 1, est spécifique (par exemple, l'eau, solvant polaire présente un coefficient de 1, celui du tétrahydrofurane, solvant moins polaire, est de 0.45 et celui du dichlorométhane, composé apolaire est de 0.30) ;
- **leur pouvoir d'élution ;**

La Figure (6) montre quelques exemples de solvants organiques usuels et leurs forces éluantes selon ces deux propriétés physiques.

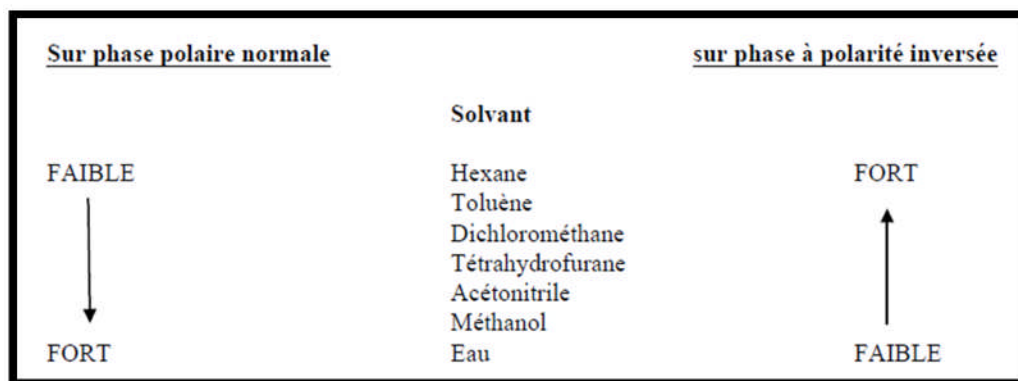


Figure (6) : Force ou pouvoir d'élution des solvants utilisés comme phases mobiles (ROUESSAC F et ROUESSAC A, 2004).

Chapitre III : La Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C)

- **Leur viscosité :**

La viscosité de la phase mobile a une influence sur : *la cinétique de transfert de masse* : une augmentation de la viscosité diminue les coefficients de diffusion et de transfert de masse des solutés c'est-à-dire qu'elle diminue le nombre de plateaux théoriques ;

- *la pression en tête de colonne* : La pression d'entrée de colonne augmente proportionnellement la viscosité de la phase éluante.

En général, on utilise des solvants dont la viscosité est inférieure à 10^{-3} Pa s (JACOB, 2011).

- **Température d'ébullition** : Dans la mesure du possible, on évite des solvants trop volatils à la température ambiante car il peut se produire un phénomène de dégazage au niveau du système de détection, ce qui rend la détection impossible. Le solvant passe alors d'une pression très élevée (100 – 200 bars) à la pression atmosphérique (JACOB, 2011).
- **pureté des solvants** : La pureté des solvants est indispensable pour la chromatographie liquide pour améliorer le seuil de détection (MUNIER, 1972).

III.4. L'appareillage de l'H.P.L.C :

En raison des pressions élevées qui doivent être appliquées pour assurer des débits raisonnables lorsqu'on utilise des supports dont le diamètre particulaire est de l'ordre de 2 à 10 μm , l'appareillage requis pour cette méthode d'analyse est ainsi nécessairement plus sophistiqué et plus coûteux que celui utilisé pour d'autres méthodes chromatographiques (MARVIN et MASTER, 2007).

C'est pourquoi, on retrouvera dans tout appareil de HPLC les éléments de base suivants (Figure (7)) :

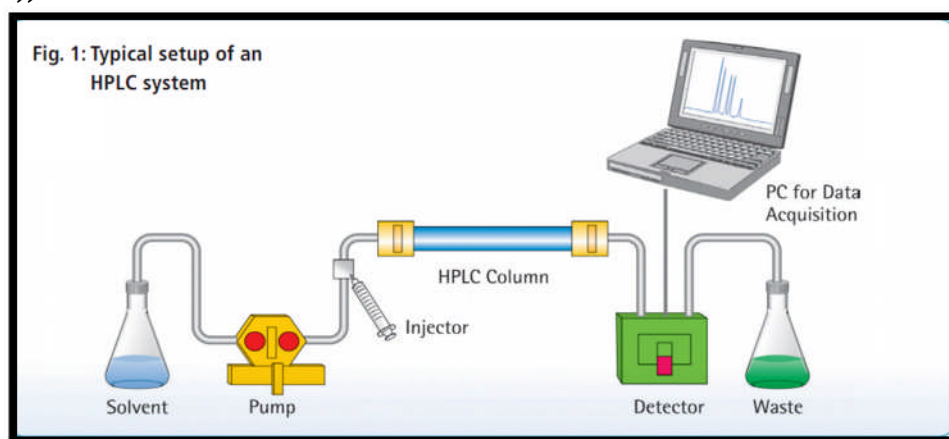


Figure (7) : Configuration typique du système d'H.P.L.C (BRAND, 2014).

- ◇ **Un réservoir de solvant (éluant) :**

Les appareils sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs en verre ou parfois en acier inoxydable de contenance d'environ 1 litre, ce qui permet de réaliser un nombre important d'analyses sans interruption.

Chapitre III : La Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C)

Ces réservoirs sont souvent étanches afin d'éviter l'évaporation des solvants (et ainsi la modification de la composition du mélange) ou leur contamination.

Ils peuvent être équipés de dispositifs de dégazage permettant d'éliminer les gaz dissous et en particulier l'oxygène (AUDIGIE *et al*, 1995).

◇ Les pompes :

Est la partie du dispositif qui a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne (JACOB, 2011). Toute installation de chaîne HPLC comporte au moins 1 pompe, dont le but est de forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne, elle permet de travailler :

- **En mode isocratique** : on utilise un solvant pur ou un mélange de solvants de composition constante dans le temps ;
- **En mode gradient** : on utilise un mélange de solvants de composition variable dans le temps.

Elles doivent permettre à la fois :

- Obtention de pressions allant jusqu'à 420 bars ;
- Absence de pulsations ;
- Débit compris entre 0,1 ml et 10ml /min ;
- Résistance à la corrosion quelque soit le solvant (WANG *et al*, 2004).

Les pompes maintiennent un débit constant quelque soit la pression. Toutefois, il est possible de travailler avec un débit variable pour améliorer la résolution d'un mélange (BURGOT G *et* BURGOT JL, 2011).

◇ Les injecteurs :

Ils sont de deux types.

- **L'injecteur à dépôt direct** : il est réalisé par injection à l'aide d'une seringue au centre de la colonne à travers un septum. Actuellement ce système n'est plus utilisé en raison d'une faible reproductibilité ;
- **Vanne à boucle externe** : c'est le système actuellement le plus utilisé. La quantité injectée est très reproductible (volumes injectés entre 10µl à 100µl de composés à analyser) en un temps bref en tête de colonne. Le système peut être éventuellement automatisé (BORREMANS *et al*, 2004).

◇ Les colonnes :

C'est la partie active du système, elle joue le rôle prépondérant. La colonne est un cylindre calibré généralement en acier inoxydable parfois doublé d'un matériau inerte (verre ou plastique spéciaux à paroi épaisse dans le domaine des basses pressions (<40 bars) (CAN *et al*, 2012). La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm, avec des tailles particulières de 5 à 10 µm. Ce type de colonne offre souvent de 40000 à 60000 plateaux par mètre. La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés (EL- ENANY *et al*, 2007).

La colonne dépend du type de chromatographie en phase liquide que l'on veut réaliser et du nombre de composés que l'on veut séparer. L'affinité dépend de la polarité des analytes et

Chapitre III : La Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C)

des phases. En mode normal, la phase stationnaire est polaire, en mode inverse elle est apolaire (BRUZUAL-ALFONZO *et al*, 2010).

◇ Les Détecteurs :

Les détecteurs utilisés en HPLC sont spécifiques à chaque application et ils doivent avoir les caractéristiques suivantes :

- Une réponse proportionnelle à la concentration de la substance détectée ;
- Une sensibilité élevée ;
- Une réponse rapide et réagir instantanément à la variation de la concentration ;
- Une grande stabilité du signal (avoir une ligne de base horizontale et la moins bruitée que possible) (UMBER, 2005).

Le choix d'un détecteur dépend de la nature des substances à analyser ou à doser. Parmi les détecteurs utilisés en HPLC sont :

- **Détecteur par spectroscopie UV-Visible** : c'est le type de détecteur le plus répandu, il est basé sur la mesure de la différence d'absorption entre le solvant et/ou solvant plus le soluté (UMBER, 2005).
- **Détecteur fluorométrique** : utilisé pour la détection des substances fluorescentes, l'intensité lumineuse est proportionnelle à la concentration de la substance fluorescente. Ce type de détecteur est très sensible et très sélectif.
- **Détecteur réfractométrique** : il mesure la différence entre l'éluant pur et l'éluant en sortie de la colonne (éluant plus l'échantillon)
- **Détecteur électrochimique** : Leur principe repose sur les propriétés oxydo-réductrices des solutés. Les applications de la détection électro- chimique se sont limitées à l'utilisation de solutions aqueuses salines afin d'assurer la conduction du courant.
- **Détecteur par spectrométrie de masse (couplage HPLC / SM)** : ce type de détecteur est très sensible, il permet de détecter tous les types de molécules volatiles et peut servir à identifier les molécules inconnues (PANT, 2012).

III.5. Exploitation des résultats d'une H.P.L.C :

Le but de toute séparation chromatographique est de fournir une analyse de l'échantillon, cette dernière est dite qualitative si elle permet de déterminer le nombre et la nature des composants de l'échantillon, et quantitative si elle permet de déterminer la quantité d'un ou plusieurs composants de cet échantillon (TOUBAL *et* HADJOUT, 2014).

III.6. Domaines d'applications :

La HPLC est une technique de séparation très puissante, Elle couvre tous les domaines d'application.

❖ En agro-alimentaire :

- la détermination de la teneur en acide carboxylique (acide lactique, acétique, malique succinique et citrique) dans les boissons ou le vin après dérivatisation ;

Chapitre III : La Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C)

- l'analyse des résidus de pesticides, des additifs (conservateurs, Antioxydant...) ou des toxines ;
 - L'analyse des hydrates de carbone (sucre, amidon...) ;
 - La recherche d'impuretés dans les matières premières.
- ❖ **En pharmacie :**
- L'analyse quantitative et identification du principe actif dans les préparations pharmaceutiques ;
 - Les études de stabilité des matières premières et des spécialités pharmaceutiques ;
 - Les études pharmacocinétique et métabolique des médicaments ;
 - Les études de suivi thérapeutique : analyse de médicaments à marge thérapeutique étroite dans les milieux biologiques pour ajuster leur posologie.
- ❖ **En biopharmacie :** Analyse de la masse molaire de peptides, protéines, nucléotides et analyse protéomique (identification ; isolement et purification des protéines cellulaires...) ou métabolomique (recherche de biomarqueurs) (**BURGOT G et BURGOT J-L, 2011**).

III.7. Les caractéristiques de l'H.P.L.C :

La H.P.L.C se distingue de la chromatographie classique par les caractéristiques suivantes :

- ✓ Colonnes de petits diamètres (2 à 5mm) réutilisables ;
- ✓ Remplissage de la colonne par un matériau composé de très fines particules (2 à 50 nm) ;
- ✓ Pression élevée à l'entrée de la colonne et contrôle du débit de la phase mobile ;
- ✓ Echantillons introduits en faibles quantités (**GOMEZ-ARIZA et al, 2005**).

III.8. Les avantages et les inconvénients :

III.8.1. Avantages de l' H.P.L.C :

- Elle constitue un outil puissant et polyvalent pour séparer des espèces chimiques voisines ;
- L'introduction de l'échantillon se fait avec une grande précision ;
- Utilisation de détecteurs spéciaux extrêmement sensibles ;
- Appareils standardisés et automatisés ;
- Analyse rapide avec résolution élevée (**SEAMUS et HIGSON, 2003**).

III.8.2. Inconvénients de l' H.P.L.C :

- De grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution ;
- La durée de l'élution est généralement très longue ;
- La détection des composés exige une attention constante ;
- Elle est adaptée à la purification de faible quantité de produit ;
- Méthode très empirique car sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais (**SEAMUS et HIGSON, 2003**).

Partie Expérimentale

Matériels & méthodes

Chapitre IV : Matériel & méthodes

Le travail expérimental a été réalisé en totalité au niveau du laboratoire de chimie analytique situé au niveau du complexe biomédical de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou.

IV.1. Matériel et méthodes :

IV.1.1. Matériel :

➤ Appareils :

- Unité de chromatographie (HPLC) avec tous ses accessoires ;
- Un homogénéisateur de type STUART^R « heat-stir /SB162/ » ;
- Balance analytique de type KERN /ALT 220-5 DAM/ ;
- Ultrason de type AL 04-06;
- Appareil d'ultrafiltration milli Q 18 méga ;
- Micropipette ;
- Filtre millipore=Nylon*66 de 0.45µm ;
- Verrerie (fioles jaugées, éprouvettes, béchers, ...) ;
- Des filtres ordinaires, pipettes pasteur, barreaux magnétiques, papier aluminium...etc.

➤ Réactifs et produits chimiques :

- L'eau ultra pure;
- L'acétonitrile ou méthane nitrile ACN (C₂H₃N) (≥ 99.8 %) ;
- L'acide ortho-phosphorique (H₃PO₄) de pureté (85%);
- l'éthanol (C₂H₆O₅), 96 % (v/v).

IV.1.2. Méthodes d'analyses :

➤ IV. 1. 2. 1. prélèvement et préparation des échantillons :

Notre étude a été réalisée sur quinze (15) échantillons d'un même jus de fruits (même unité de production) qui provenaient de plusieurs points de vente choisis au hasard à Draa Ben Khedda. Ces quinze échantillons correspondent à cinq fabrications différentes du même jus; de chaque fabrication, trois (3) lots ont été prélevés ; ces derniers comportent les mêmes indications et les mêmes dates de production et de péremption sur leurs étiquettes.

Une fois au laboratoire, les échantillons ont été codés et étiquetés avant d'être conservés au réfrigérateur.

1 ^{ere} fabrication			2 ^{eme} fabrication			3 ^{eme} fabrication			4 ^{eme} fabrication			5 ^{eme} fabrication		
lot I	lot II	lot III	lot I	lotII	lot III	lot I	lotII	lot III	lot I	lotII	lot III	lot I	lotII	lot III
F : 02/02/15			F : 04/02/15			F : 01/03/15			F : 16/03/15			F : 24/03/15		
E : 01/08/15			E : 03/08/15			E : 28/08/15			E : 12/09/15			E : 20/09/15		

➤ IV. 1. 2. 2. Techniques d'analyses utilisées :

L'étude consiste en un dosage de deux conservateurs utilisés en technologie agro-alimentaire et surtout dans l'industrie des jus et de boissons gazeuses ; il s'agit du benzoate de sodium et du méthyl parabène. Le dosage est effectué par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (**RP-HPLC**). Pour l'utilisation de cette technique, il est important et obligatoire de procéder avant tout à sa validation analytique.

❖ validation analytique de la méthode (H.P.L.C) :

La validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée (**Vial, 2002**).

La validation entraîne la détermination de plusieurs paramètres et de certains points clés à savoir: la spécificité, la linéarité, la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la justesse, la sensibilité, et finalement, la robustesse.

♦ **La spécificité** : Une méthode est spécifique si elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt. Elle permet d'évaluer une substance en présence d'autres composés (impuretés, produits de dégradation, matrice...) (**KUMAR et al, 2011**).

♦ **La fidélité** : Étroitesse d'accord entre les résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées. La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou la valeur spécifiée. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de replicabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode (**Norme ISO 3534-2**).

♦ **L'exactitude** : Étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai ou le résultat d'une mesure et la valeur vraie. Dans la pratique, la valeur de référence acceptée est substituée à la valeur vraie. L'exactitude se réfère à une combinaison de justesse et de fidélité (**Norme ISO 3534-2**) ;

♦ **La justesse**: Étroitesse de l'accord entre l'espérance mathématique du résultat d'essai ou de mesure et la valeur vraie. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de biais. La justesse a été également appelée « exactitude de la moyenne ». En pratique, la valeur de référence acceptée est substituée à la valeur vraie (**Norme ISO 3534-2**).

♦ **La robustesse**: Mesure de la capacité d'une méthode analytique de ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées dans les paramètres de méthode; elle donne une indication de sa fiabilité durant une utilisation normale (**ICH Topic Q2 A Validation, 1995**).

♦ **La linéarité** : La limite de linéarité est le plus haut niveau fiable de mesure qu'on puisse utiliser en tenant compte de tous les facteurs à considérer dans une méthode.

Les limites de linéarité sont les limites expérimentales de concentrations entre lesquelles un modèle d'étalonnage linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu (généralement considéré comme égal à 1 pour cent) (**Commission du Codex alimentarius, 2006**).

Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité.

Chapitre IV : Matériel & méthodes

Pour la détermination des points clés de la validation appelés aussi, critères de performance et de prestation (paramètres cités ci-dessus), deux gammes ont été préparées :

- ✓ la gamme standard : cette gamme est constituée de concentrations croissantes d'acide benzoïque, diluées dans un diluant constitué d'eau pure, d'acide ortho-phosphorique et d'acétonitrile.
- ✓ La gamme matrice : préparée d'un jus naturel sans conservateur + le diluant.

La détermination et la vérification de chaque facteur de validation est réalisé en effectuant à chaque fois, trois essais différents.

❖ Dosage du benzoate de sodium dans le jus analysé :

1/ Préparation de la gamme standard utile pour tracer la courbe étalon :

- préparer 3 solutions mères avec des concentrations croissantes de benzoate de sodium (50 mg, 100 mg et 150 mg) dans des fioles de 100 ml;
- ajouter un volume de diluant à chaque fiole jusqu'au trait de jauge;
- de chaque solution mère, prélever 5 ml à mettre dans une fiole de 50ml ;
- ajuster avec le diluant jusqu'au trait de jauge (solutions filles) ;
- 1 ml de chaque solution diluée est placé dans l'appareil.

On obtient alors une courbe d'équation :

$$Y = bx + a$$

Qui nous servira au calcul des concentrations du benzoate de sodium dans les échantillons de jus analysés.

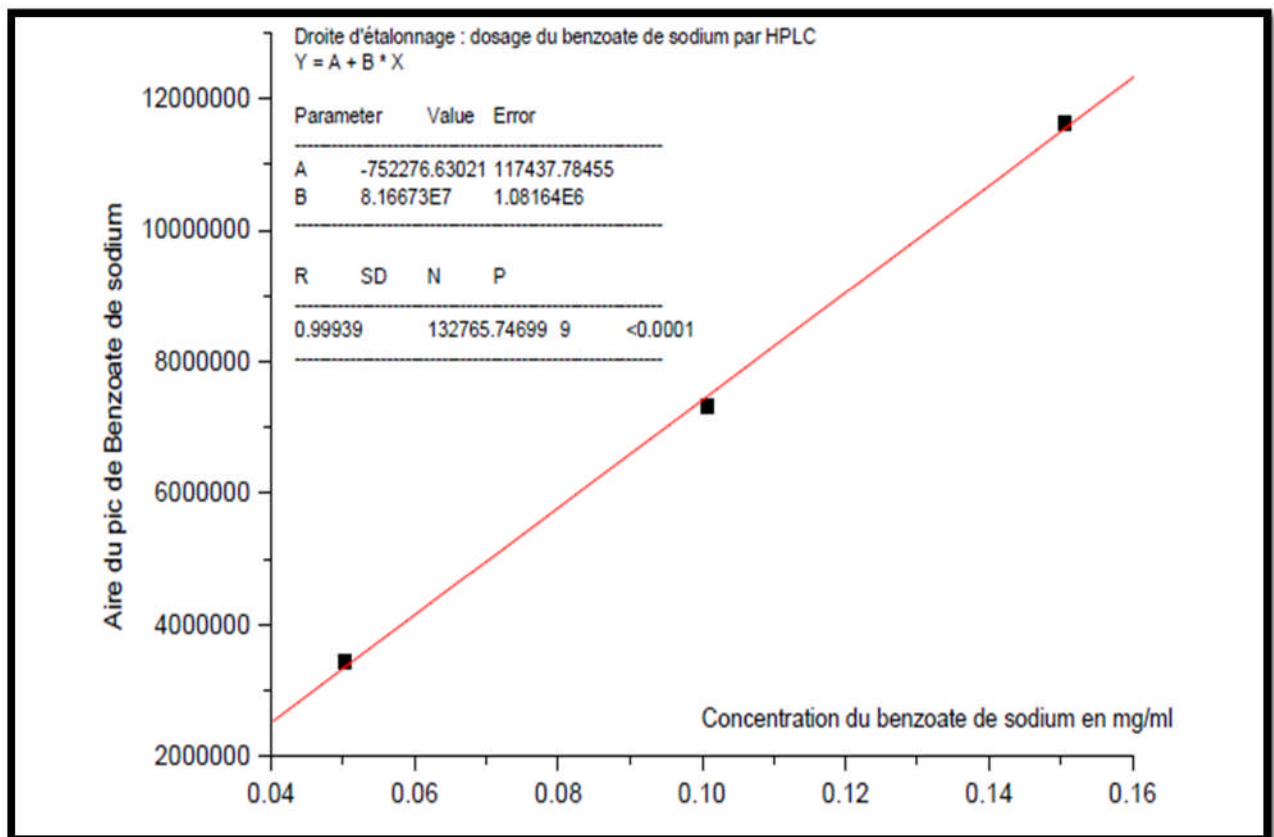


Figure (8) : Courbe d'étalonnage : Aire de pic ($\mu V \cdot \min$) du benzoate de sodium en fonction de sa concentration (mg/ml).

2/ Préparation de la gamme pour dosage (les échantillons à analyser) (annexe 1):

La gamme à analyser est composée de 15 échantillons ; elle est préparée comme suit :

- ◆ Filtration des jus à analyser ;
- ◆ 5 ml de chaque jus sont prélevés et mis dans une fiole de 50 ml ;
- ◆ Ajouter le diluant jusqu'au trait de jauge ;
- ◆ Homogénéiser et dégazéifier les échantillons à l'aide d'un ultrason pendant 3 minutes ;
- ◆ A l'aide d'une micropipette, prélever de chaque fiole un échantillon de 1 ml ;
- ◆ Verser les échantillons dans les tubes spécifiques à l'appareil (la gamme pour le dosage);
- ◆ Mettre les échantillons dans l'appareil pour le dosage.

3/Préparation de l'appareil à (HPLC):

La méthode d' H.P.L.C utilisée est celle de partage en phase inverse **RP-HPLC**. Elle se base sur les différences de solubilité des composés dans deux phases liquides non-miscibles : la phase stationnaire de type **RP-18** (greffée sur des billes de silice) apolaire ; la phase mobile polaire constituée de : Eau/acétonitrile/H₃PO₄ : 600/400/1 ml (*annexe 2*).

➤ Les conditions chromatographiques :

- **L'échantillon** : doit être dilué au 1/10 dans le diluant ;
- **Colonne** : RP-18 de 25 cm de longueur ;
- **Volume d'injection** : 20 µl ;
- **Débit** : 1 ml/min ;
- **Détecteur** : 225 nm ;
- **Temps de rétention** : ± 5 min ;
- **Durée d'analyse** : 7 min.

4/ Calcul des concentrations de benzoate de sodium dans les échantillons analysés :

Le calcul des concentrations de benzoate de sodium dans le jus analysé se fait en se référant à la droite d'étalonnage et aux aires de pics donnés par les chromatogrammes obtenus.

Les gammes standards utilisées correspondent aux solutions mères ; alors que celles mentionnées sur la courbe étalon, correspondent aux dilutions préparées (solutions filles) qui vont être déduites de la formule suivante :

$$C_i = C_f / F$$

- ✓ **C_i** : La concentration initiale de benzoate de sodium (la solution mère) en (mg/L) ;
- ✓ **F** : facteur de dilution qui est de 1/10 ;
- ✓ **C_f** : La concentration finale de benzoate de sodium (solution fille) en (mg/ml).

Chapitre IV : Matériel & méthodes

Donc, d'après la courbe d'étalonnage nous avons:

$$y = bx + a \quad \longleftrightarrow \quad X = y - a / b$$

Et : $b = 8.16673. 10^7$; $a = - 752276$

$$\longrightarrow y = 8.16673. 10^7 x + 752276 \quad \longleftrightarrow \quad X = y + 752276 / 8.16673. 10^7$$

y = aire de pic donné par le chromatogramme ;
x = concentration du benzoate de sodium à calculer (mg/ml).

Pour mieux comprendre le mode de calcul suivi pour ce dosage, nous avons pris comme exemple l'échantillon n° 10.

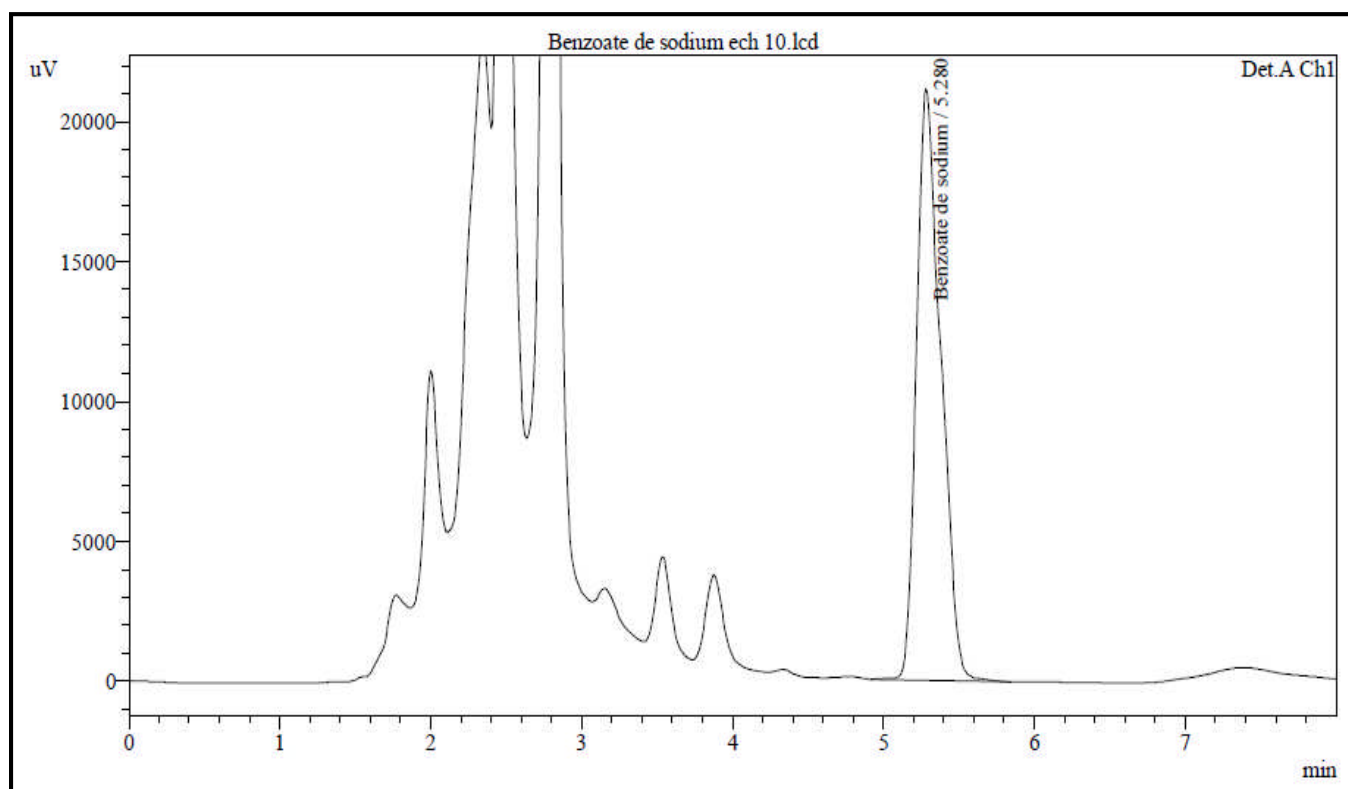


Figure (9) : Chromatogramme de l'échantillon n° 10

Informations chromatographiques concernant l'échantillon n° 10 données par l'appareil :

Echantillon	Temps de rétention (min)	Aire de pic (µV.min)	% de l'aire de pic	RSD %
Ech (N°=10)	5.280	236724	3.031%	61.595%

En suivant la formule :

$$X = y + 752276 / 8.16673. 10^7$$

$$X = (236724 + 752276) / 8.16673. 10^7 \longrightarrow$$

$$X = 1.211011. 10^{-2} \text{ mg/ml.}$$

La concentration en benzoate de sodium de l'échantillon (10) en ppm, est déduite en appliquant l'équation suivante :

$$C_i = C_f / F$$

$$C_i = (1.211011. 10^{-2} / 1/10) * 1000 \text{ ppm} = 121.11 \text{ ppm.}$$

Donc :

$$[C]_{\text{benzoate de sodium}} = 121.11 \text{ ppm.}$$

❖ Dosage du méthyl parabène dans le jus de fruits analysé:

1/ validation analytique de la méthode (H.P.L.C):

Les mêmes paramètres ont été déterminés à savoir :

La spécificité, la linéarité, la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la justesse, la sensibilité, et finalement, la robustesse. Leur détermination se fait en utilisant une gamme standard et une gamme matrice pour méthyl parabène.

2/ Préparation de la gamme standard pour tracer la courbe étalon :

- préparer 5 solutions mères avec des concentrations croissantes de méthyl parabène (20 mg, 40 mg, 60 mg, 80 mg et 100 mg) dans des fioles de 100 ml;
- ajouter un volume de diluant constitué de : [Eau/éthanol: 600/400], à chaque fiole jusqu'au trait de jauge;
- de chaque solution mère ainsi formée, prélever 5 ml à mettre dans une fiole de 50ml ;
- ajuster avec le diluant jusqu'au trait de jauge (solutions filles) ;
- 1 ml de chaque solution diluée est placé dans l'appareil.

Lors de la validation analytique de la méthode (HPLC), un test de comparaison de L'ordonnée avec 0 est effectué. Les résultats obtenus, ont montré que statistiquement, l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0.

De ce fait, la courbe étalon obtenue est d'équation :

$$Y = ax \text{ avec } (b = 0)$$

Chapitre IV : Matériel & méthodes

3/Préparation de la gamme pour dosage (annexe 1) :

Nous avons suivis les mêmes étapes de préparation de la gamme pour le dosage du benzoate de sodium. La différence est dans le diluant qui dans le cas du méthyl parabène, est composé de : [Eau/éthanol : 600/400 ml].

4/ Les conditions chromatographiques pour le méthyl parabène :

- ✓ **Colonne:** RP-18 de 15 cm de longueur ;
- ✓ **La phase mobile :** eau / éthanol : 50 / 50 ;
- ✓ **Débit :** 1ml/min ;
- ✓ **Volume d'injection:** 20 μ l ;
- ✓ **Détecteur :** 254 nm ;
- ✓ **L'échantillon :** doit être dilué au 1/10 dans le diluant ;
- ✓ **Temps de rétention:** $\pm$ 4 min ;
- ✓ **Durée d'analyse :** 5.5 min.

5/ Calcul de la concentration du méthyl parabène dans les échantillons de jus analysés:

La droite d'étalonnage obtenue passe par l'origine, donc pour la tracer on peut se contenter d'une seule prise d'essai. Nous avons utilisé au hasard la prise de 59.30 mg, ce qui nous a donné le chromatogramme suivant :

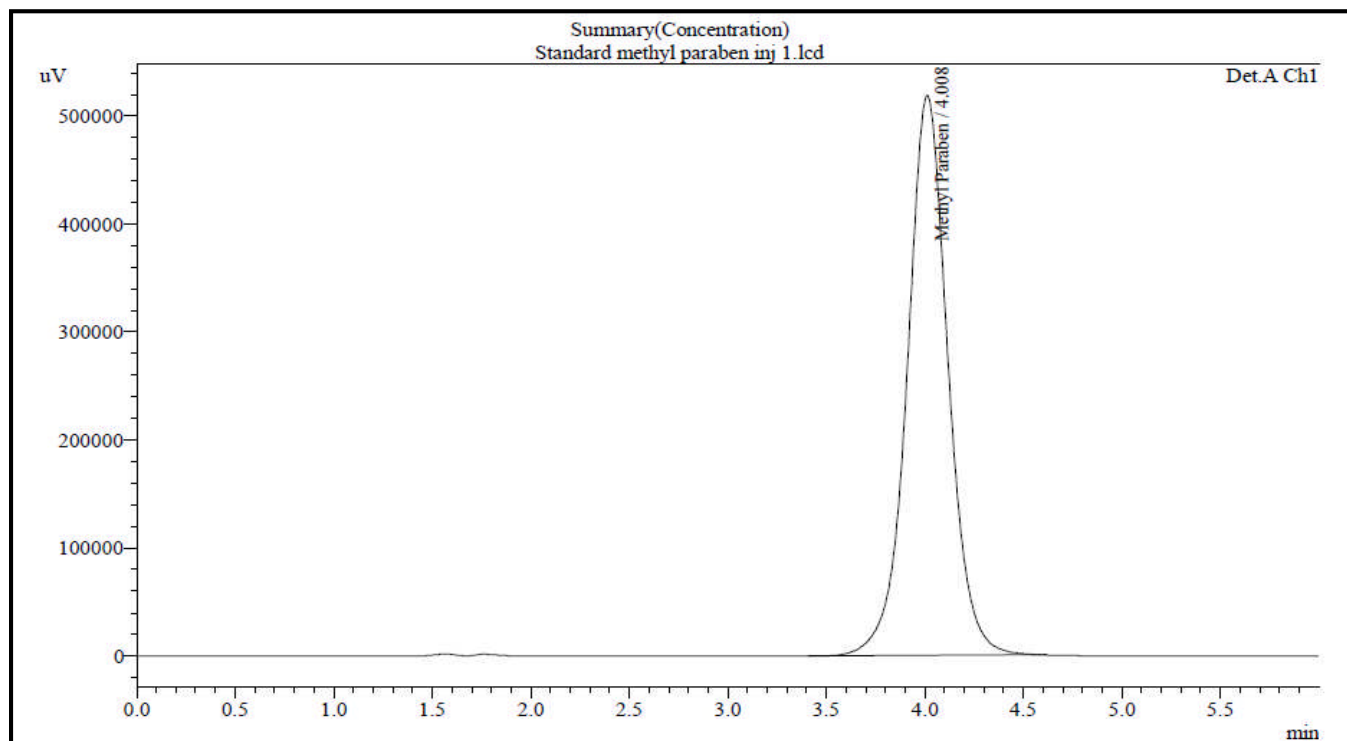


Figure (10) : Chromatogramme d'une prise standard de méthyl parabène

Chapitre IV : Matériel & méthodes

Les données chromatographiques de la prise d'essai :

Echantillon	Temps de rétention (min)	Aire de pic (µV.min)	RSD %	% de l'aire de pic	Moyenne des aires de pics standards	Ecart-type
Standard de méthyl parabène	4.008	7507134	0.041 %	16.657%	7511120	3051

Pour démontrer la méthode du calcul de la concentration du méthyl parabène dans le jus analysé, nous avons pris un exemple d'échantillon au hasard qui est l'échantillon n° 13.

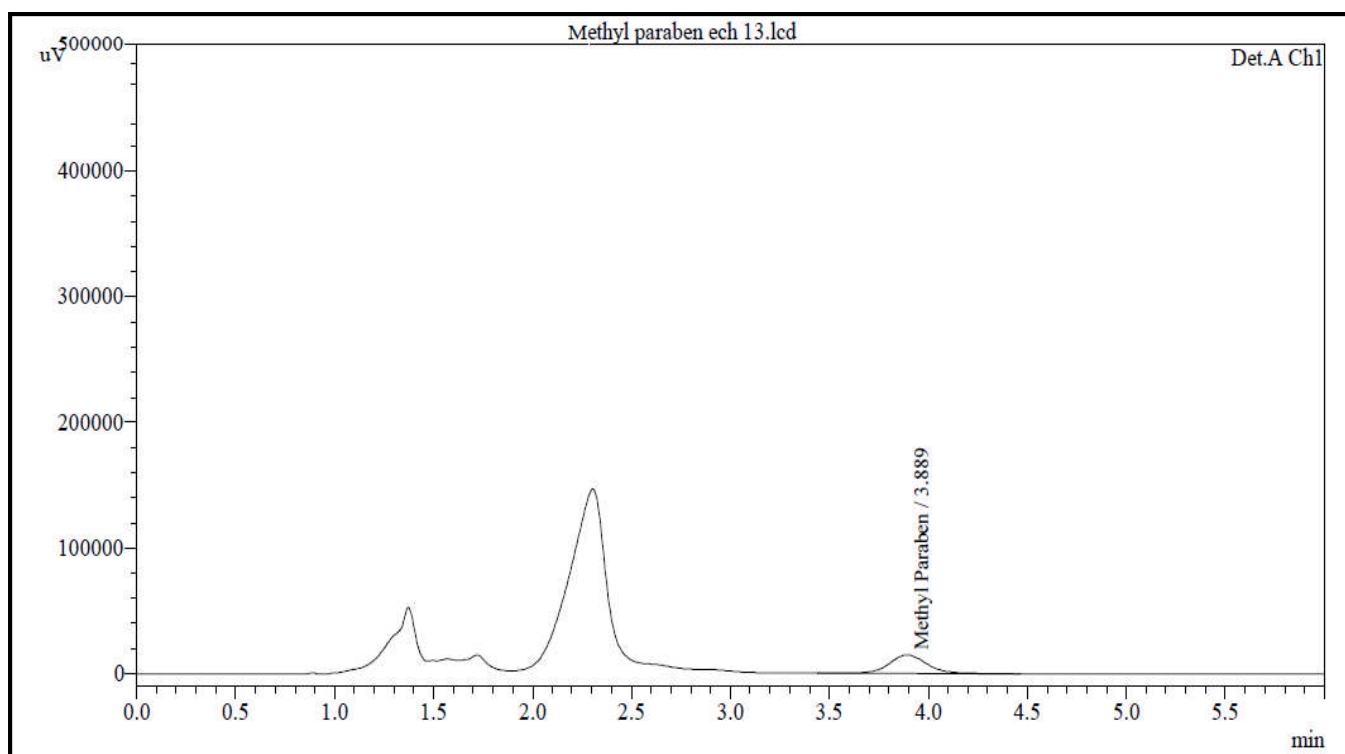
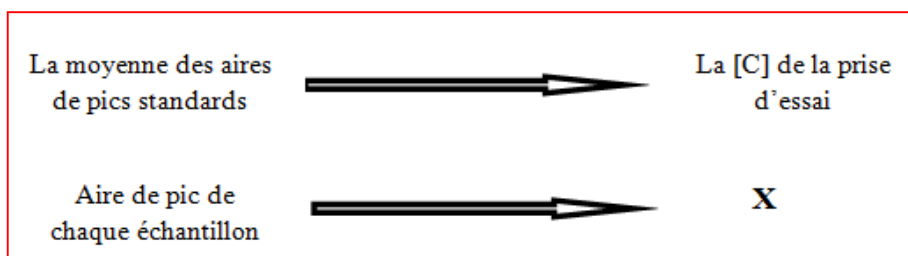


Figure (11) : Chromatogramme de l'échantillon de jus n° 13

Les données chromatographiques de l'échantillon n° 13 :

Echantillon :	Temps de rétention (min) :	Aire de pic (µV.min) :	% de l'aire de pic :	RSD %:
Ech (N°=13)	3.889	196652	86.140%	318.331%

Chapitre IV : Matériel & méthodes



- ✓ La moyenne des aires de pics standards est de : 7511120 $\mu\text{V}\cdot\text{min}$;
- ✓ La [C] de la prise d'essai est : 0.593mg/ml ;
- ✓ Aire de pic de l'échantillon N°=13 : y=196652 $\mu\text{V}\cdot\text{min}$;
- ✓ X= la concentration à déterminer.

D'après la formule, on déduit la concentration de méthyl parabène dans l'échantillon comme suit :

$$X = 196652 \cdot 0.593 / 7511120$$

$$X = 0.01553 \text{ mg/ml}$$

La concentration de méthyl parabène en ppm dans l'échantillon de jus n°13 est de :

$$X = 0.01553 \cdot 1000 \text{ ppm}$$

Donc :

$$[C]_{\text{méthyl parabène}} = 15.53 \text{ ppm.}$$

❖ Analyse d'un échantillon de jus témoin :

C'est un test de confirmation qu'on a réalisé sur un jus portant une étiquette sur laquelle est mentionné : « Sans conservateurs ».

Le conservateur recherché est le benzoate de sodium. L'analyse de cet échantillon a été réalisée dans les mêmes conditions chromatographiques suivies pour le dosage de benzoate de sodium.

A crowd of white 3D human figures is shown from the back, standing on a light gray surface. Above them are several red speech bubbles of various sizes, some overlapping. A white rectangular box with a red border is positioned in the upper middle of the image, containing the text 'Résultats & discussion' in a black serif font.

Résultats & discussion

Chapitre V : Résultats & discussion

V.1. Résultats et discussion :

V.1.1. résultats du dosage de benzoate de sodium :

Les résultats de dosage du benzoate de sodium dans le jus de fruits analysé par la chromatographie liquide à haute performance sont consignés dans le tableau (XI) :

Tableau (XI) : Résultats de dosage du benzoate de sodium

<i>Echantillons</i>	<i>Aire de pic (μV.min)</i>	<i>Concentration en mg/ml</i>	<i>Concentration en ppm</i>	<i>Limite maximale d'emploi</i>
<i>Ech 1</i>	485814	0,15160	151,60	1000 ppm
<i>Ech 2</i>	1036919	0,21908	219,08	
<i>Ech 3</i>	966593	0,21047	210,47	
<i>Ech 4</i>	984590	0,21268	212,68	
<i>Ech 5</i>	726183	0,18103	181,03	
<i>Ech 6</i>	504772	0,15392	153,92	
<i>Ech 7</i>	919011	0,20465	204,65	
<i>Ech 8</i>	486718	0,15171	151,71	
<i>Ech 9</i>	254802	0,12331	123,31	
<i>Ech 10</i>	236724	0,12110	121,10	
<i>Ech 11</i>	297772	0,12858	128,58	
<i>Ech 12</i>	243461	0,12193	121,93	
<i>Ech 13</i>	258766	0,12380	123,80	
<i>Ech 14</i>	259504	0,12389	123,89	
<i>Ech 15</i>	146092	0,11000	110,00	

Les résultats obtenus montrent que les doses enregistrées oscillent entre **110 ppm** (échantillon 15) et **219,08 ppm** (échantillon 2).

Chapitre V : Résultats & discussion

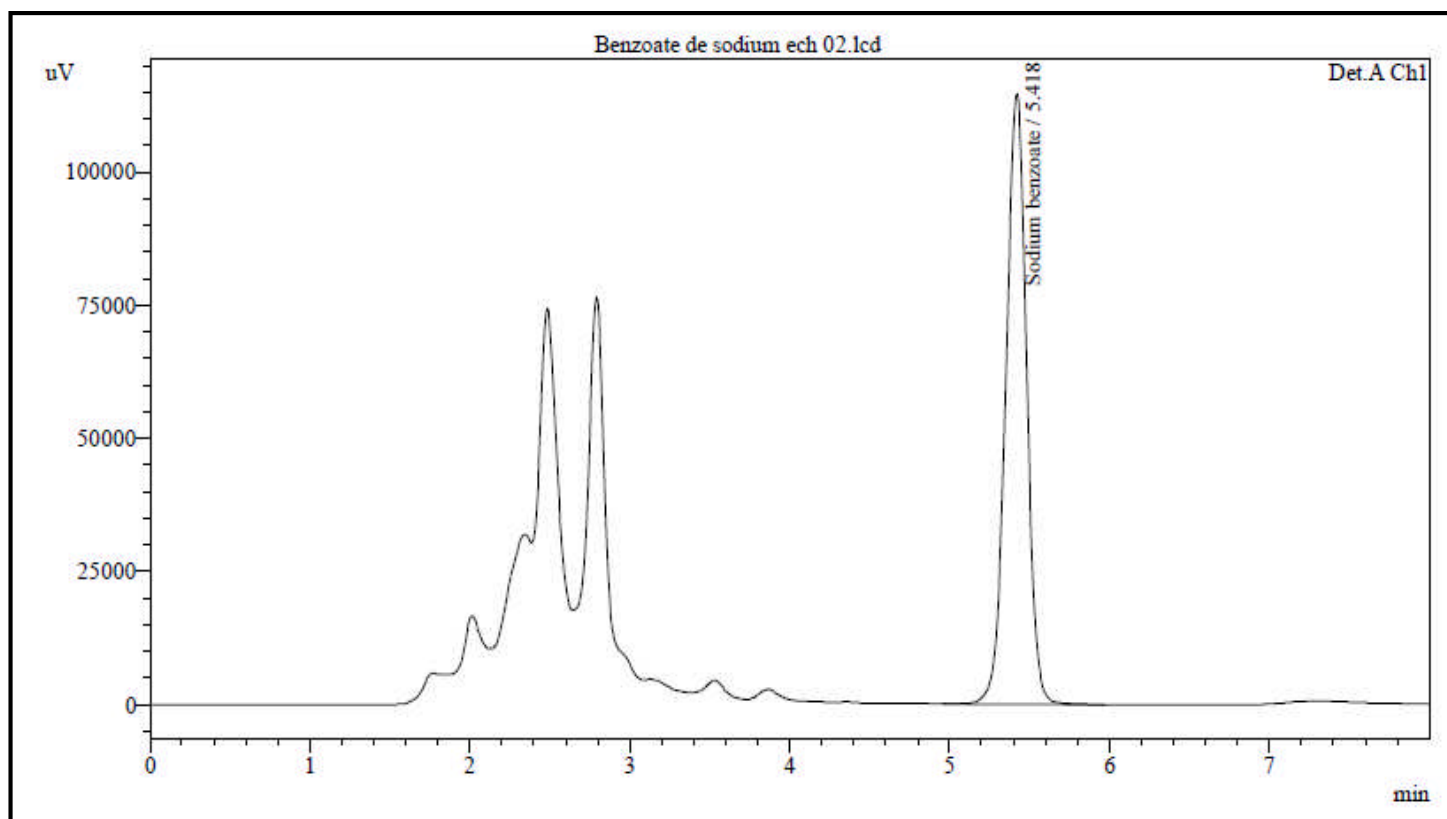


Figure (12) : Chromatogramme de l'échantillon de jus n°02.

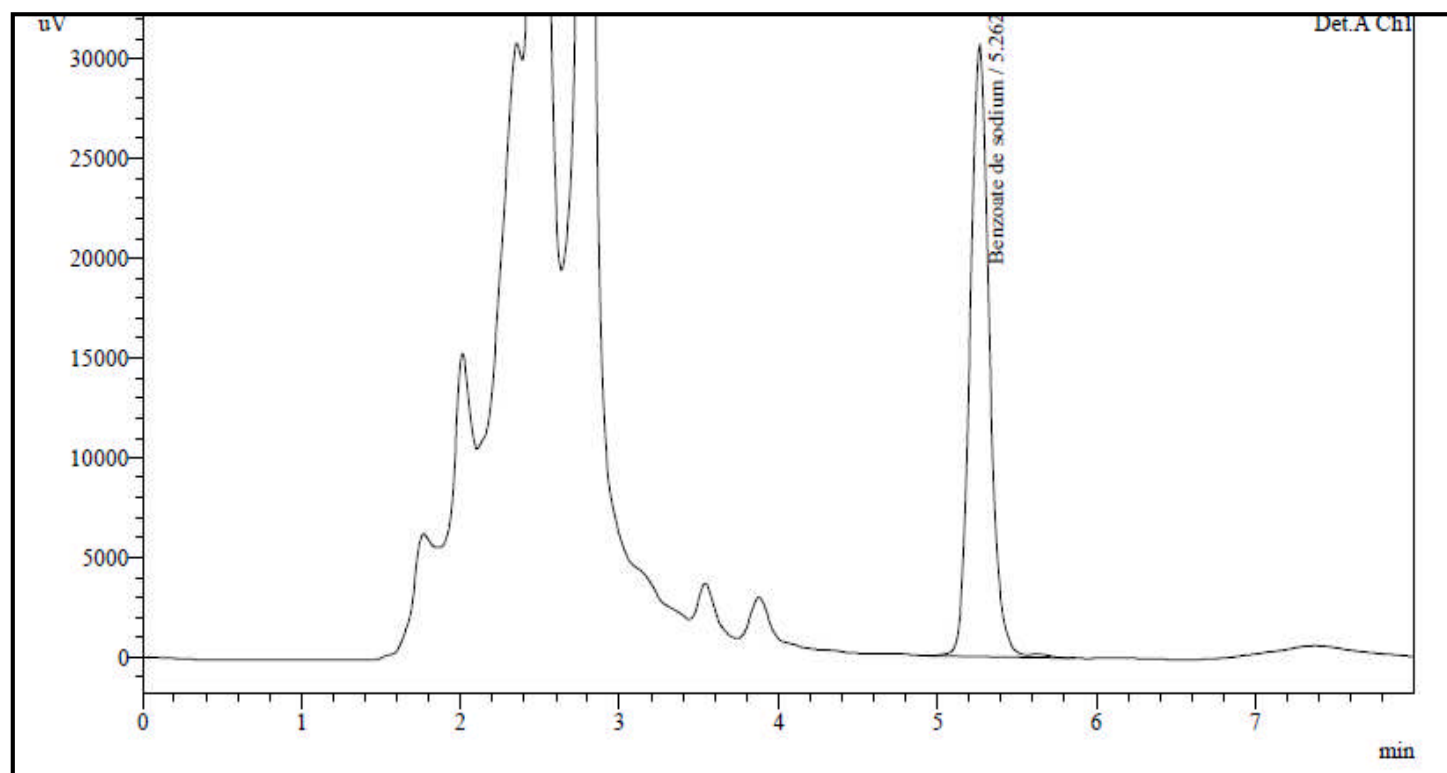


Figure (13) : Chromatogramme de l'échantillon de jus n° 15.

Chapitre V : Résultats & discussion

D'après le codex alimentarius (Codex-STAN 192-1995) relatif aux conditions d'utilisation des conservateurs dans les denrées alimentaires (**Annexe 5**), les doses maximales d'utilisations de benzoate de sodium dans les jus de fruits est de **1000 ppm**. Donc nous pouvons dire que les teneurs obtenues dans le jus analysé sont conformes aux normes du codex.

Les concentrations enregistrées sont mêmes très limitées et inférieures aux normes du codex. Ceci peut être expliqué par le fait que:

- L'unité de production de ce jus de fruits n'utilise pas uniquement le benzoate de sodium comme seul conservateur mais elle le seconde par un autre conservateur qui est le sorbate de potassium (mentionné sur l'étiquette de l'emballage).
- Le complexe bactériostatique ainsi formé « **Benzoate de sodium / Sorbate de potassium** », a une efficacité maximale et forme un mélange synergique à large spectre d'activité capable de détruire la plupart des microorganismes indésirables ;
- L'acide benzoïque et ses sels (les benzoates) sont très dangereux. Ils sont même listés « *possiblement cancérigènes* » par l'Association pour la Recherche Thérapeutique Anticancéreuse (ARTAC, France).

Une étude publiée en Septembre 2007 par la revue médicale Lancet, démontre l'impact non négligeable des boissons contenant du benzoate de sodium sur la santé. En effet, outre les problèmes d'hyperactivité chez les enfants, le benzoate de sodium, en combinaison avec la vitamine C (acide ascorbique) semblerait se transformer en benzène, un composé hautement cancérigène qui affecte le sang et a des liens avec la leucémie (**DIEZI et al 2011**).

Selon **HODGE, (2009)**, une étude menée par le professeur **Peter Piper**, professeur en biologie moléculaire et biotechnologie, confirme que le benzoate de sodium a un effet destructeur sur l'ADN. Ce qui peut être la cause de la maladie de Parkinson « maladie dégénérative » qui résulte de la mort lente et progressive des neurones du cerveau.

- Le benzoate de sodium contrairement aux autres conservateurs est un produit très coûteux, ce qui pousse les entreprises à l'utiliser en faibles quantités.

Chapitre V : Résultats & discussion

V.1.2. résultats de dosage du méthyl parabène:

Les résultats de dosage du méthyl parabène sont enregistrés dans le tableau (XII) ci-dessous :

Tableau (XII) : Résultats de dosage du méthyl parabène dans le jus analysé :

<i>Echantillon</i>	<i>Aire du pic</i>	<i>Concentration en mg/ml</i>	<i>Concentration en ppm</i>	<i>Limite maximale autorisée</i>
<i>Ech 01</i>	1960	0,00015	0.15	\
<i>Ech 02</i>	1998	0,00016	0.16	
<i>Ech 03</i>	2127	0,00017	0.17	
<i>Ech 04</i>	2522	0,00020	0.20	
<i>Ech 05</i>	3534	0,00028	0.28	
<i>Ech 06</i>	2582	0,00020	0.20	
<i>Ech 07</i>	2199	0,00017	0.17	
<i>Ech 08</i>	1942	0,00015	0.15	
<i>Ech 09</i>	2386	0,00019	0.19	
<i>Ech 10</i>	3141	0,00025	0.25	
<i>Ech 11</i>	2948	0,00023	0.23	
<i>Ech 12</i>	2167	0,00017	0.17	
<i>Ech 13</i>	196652	0,01553	15.53	
<i>Ech 14</i>	2135	0,00017	0.17	
<i>Ech 15</i>	0	0,00000	0.00	

Le dosage du méthyl parabène par (HPLC) dans le jus analysé, a révélé des teneurs ou des concentrations comprises entre 0 ppm (échantillon 15) et 0,28 ppm (échantillon 05). L'exception a été enregistrée pour l'échantillon (13) où la concentration était de 15,53 ppm.

Malgré que le jus de fruits analysé contient des concentrations très faibles en méthyl parabène, mais ces dernières sont considérées non conformes aux normes du codex.

Nous avons enregistré pour l'échantillon (13), une concentration assez élevée par rapport aux autres (15,53 ppm), ceci peut être incriminé à un défaut de manipulation.

Chapitre V : Résultats & discussion

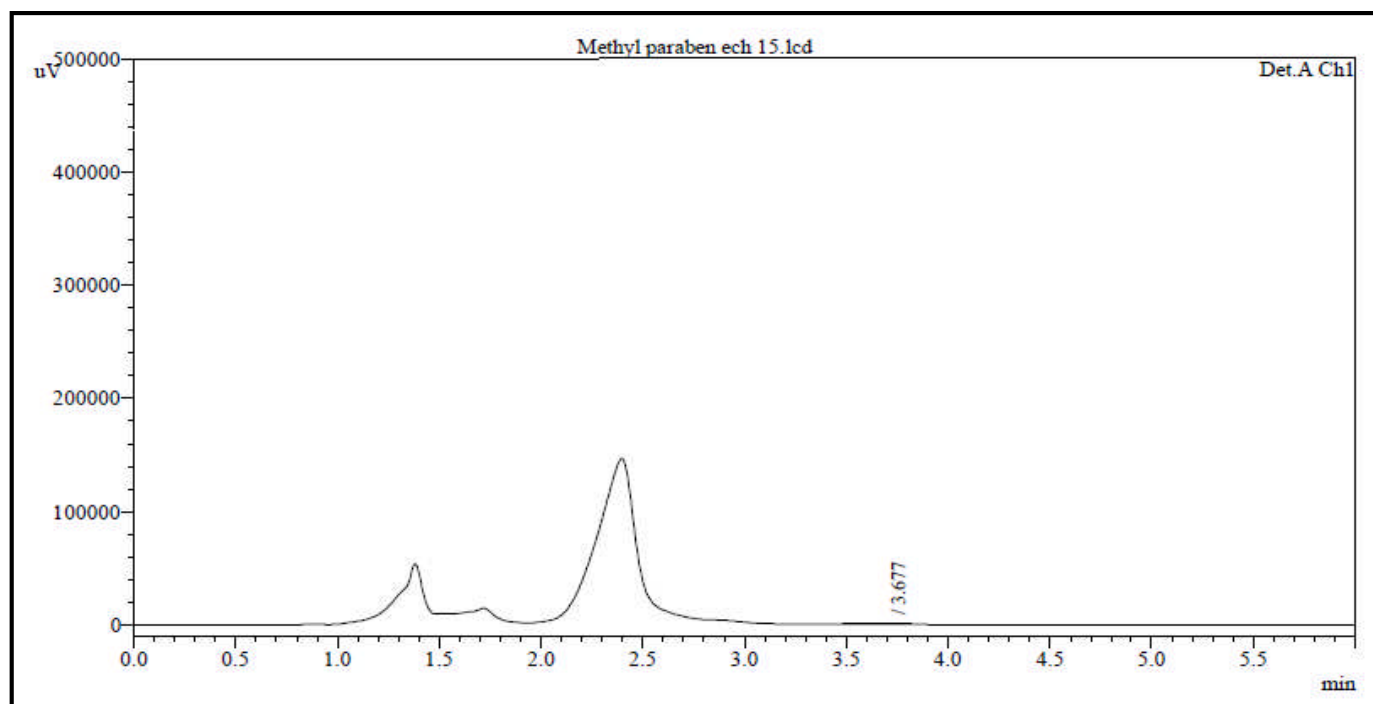


Figure (14) : Chromatogramme d'un échantillon de jus n°15.

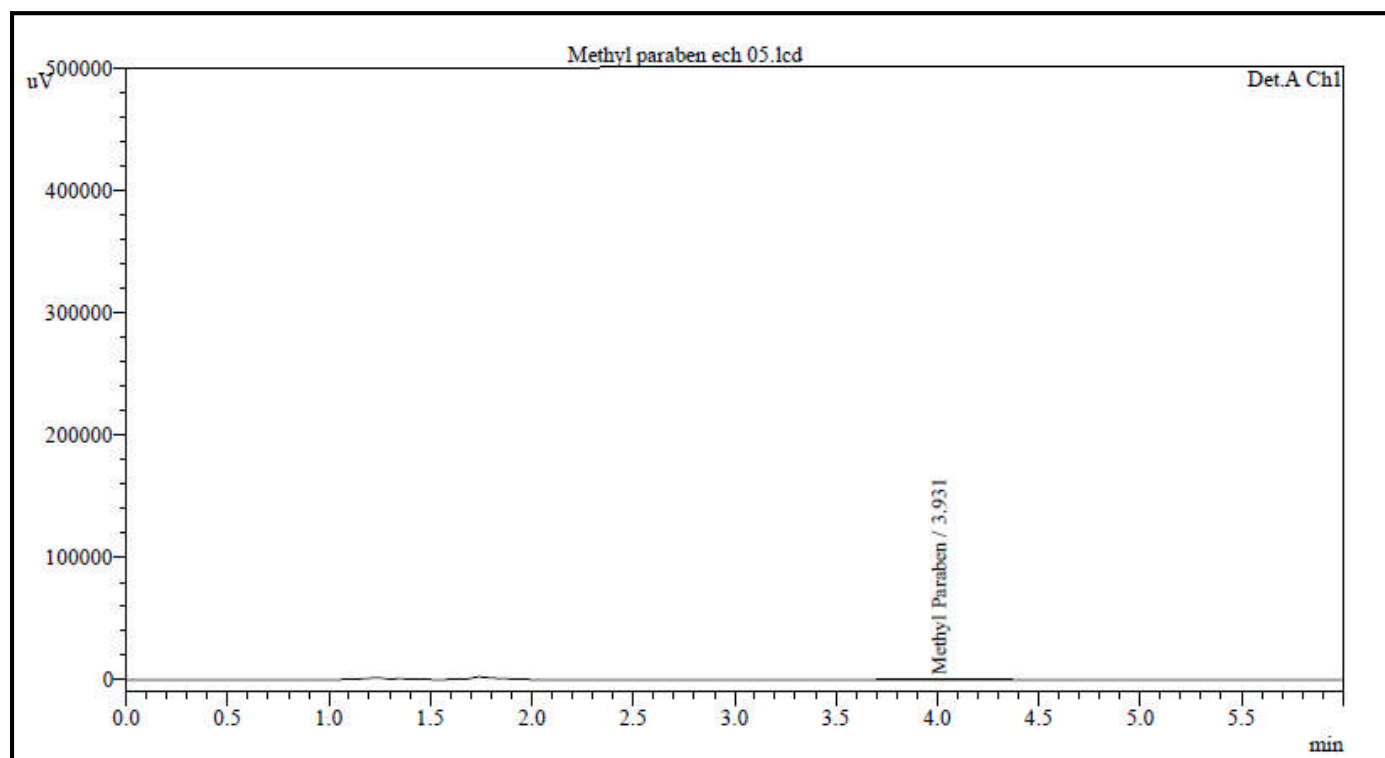


Figure (15) : Chromatogramme de l'échantillon de jus n°05.

Le codex alimentarius (**Codex-STAN 192-1995**) relatif aux conditions d'utilisation des conservateurs dans les denrées alimentaires (**Annexe 5**), a interdit l'usage du méthyl parabène dans les jus de fruits et de ce fait, aucune limite d'utilisation n'a été fixée. Donc, l'adjonction de ce conservateur interdit par la réglementation, constitue une infraction à la loi et une tromperie à l'égard du consommateur.

Nous avons constaté aussi que la mention du méthyl parabène n'a pas été signalée sur l'étiquette que comporte l'emballage du jus analysé, ceci peut être considéré comme une falsification du produit et une infraction à la réglementation en vigueur.

Selon les prescriptions du décret exécutif du 13 janvier 1992, relatif aux conditions et aux modalités d'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires, la mention des additifs ou leur mélange doit être portée sur les emballages des denrées alimentaires, rédigées en caractères visibles, lisibles et indélébiles en langue nationale et à titre complémentaire dans une autre langue.

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (**EFSA**), dans son avis de (**2004**), a évalué le risque d'utilisation des parabènes (dont le méthyl parabène) dans les aliments. De ce fait, Les parabènes, sont à l'origine d'une sérieuse controverse scientifique.

➤ Une étude publiée en 2004 par une équipe de recherche britannique (**DARBRE et HARVEY, 2008**), a documenté des cas de tumeurs cancéreuses du sein dans lesquelles les parabènes étaient détectées en quantité significative.

➤ D'autres études (**TAVARES et al, 2009**), ont démontré que les parabènes étaient capables de se lier aux récepteurs à œstrogènes, d'activer les gènes contrôlés par ces récepteurs, de stimuler la croissance cellulaire et d'augmenter le niveau des protéines réceptrices aux œstrogènes. Cela explique l'effet ostrogénique mis en évidence par plusieurs études.

➤ Les parabènes, ont un effet néfaste sur le système reproductif masculin.

En effet, plusieurs études (**TAVARES et al, 2009**), ont montré qu'un lien entre certains parabènes (notamment le méthyl parabène) et l'altération de la fonction de reproduction masculine semble probable, et peut être expliqué par le fait que la présence de parabènes dans les tissus mène à des perturbations bioénergétiques (déficit d'ATP) via une dégradation des propriétés des membranes mitochondriales. Etant donnée l'importance du rôle de ce dernier organe dans le métabolisme des testicules. Ceci pourrait expliquer les effets des parabènes observés dans les études toxicologiques sur les organes reproductifs.

V.1.3. résultats de l'analyse de l'échantillon témoin « sans conservateurs » :

Le dosage du benzoate de sodium dans le jus comportant une étiquette sur laquelle est mentionné « sans conservateurs », n'a révélé aucune trace de ce conservateur.

En effet, si on se réfère aux critères d'élution du benzoate de sodium, notamment le temps d'élution spécifique compris entre 5 et 6 min, on remarque qu'aucun pic n'a été enregistré à ce niveau (figure 16). Ceci peut confirmer l'absence du benzoate de sodium dans ce jus de fruits.

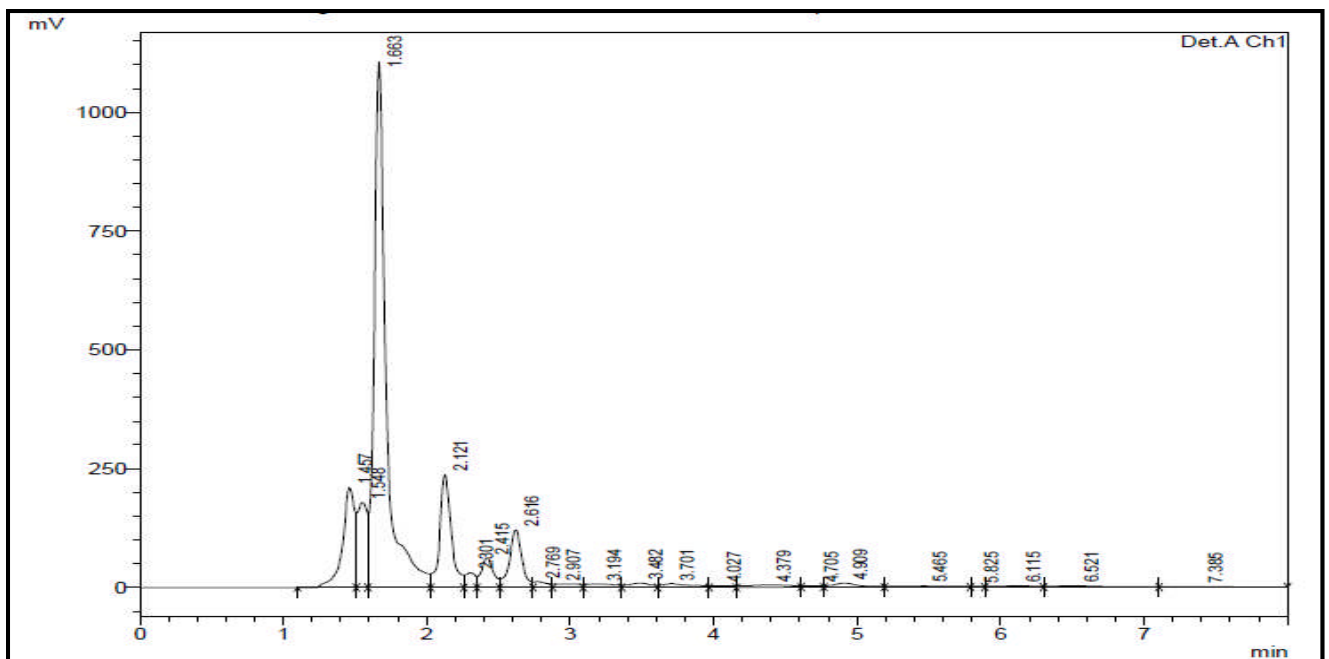


Figure (16) : Chromatogramme du jus de fruits témoin « sans conservateurs ».

L'absence de benzoate de sodium dans ce jus ne peut en aucun cas confirmer l'absence des autres conservateurs, surtout le sorbate de potassium qui est couramment utilisé dans l'industrie agro-alimentaire et surtout dans l'industrie des jus et des boissons gazeuses. Le sorbate de potassium est devenu de nos jours, un ingrédient courant dans la fabrication de nombreuses denrées alimentaires.

Les différents pics qui apparaissent sur le chromatogramme à des temps d'élution différents, correspondent aux autres constituants de ce jus. Il s'agit principalement : des sucres, l'acide citrique et correcteurs d'acidités, stabilisants, colorants...etc.

Le pic important enregistré entre 1 et 2 min sur le chromatogramme, correspond d'après la théorie à l'acide ascorbique : additif alimentaire très utilisé dans l'industrie des jus de fruits.

Conclusion

Conclusion

L'évolution des techniques alimentaires, des attentes du consommateur et amélioration technologique sont les éléments moteurs qui ont contribué au développement et une utilisation accrue des conservateurs alimentaires, dont leur emploi occupe une grande part dans le marché des jus et boissons aromatisées sans alcool qui connaissent aujourd'hui un développement prolifératif et explosif.

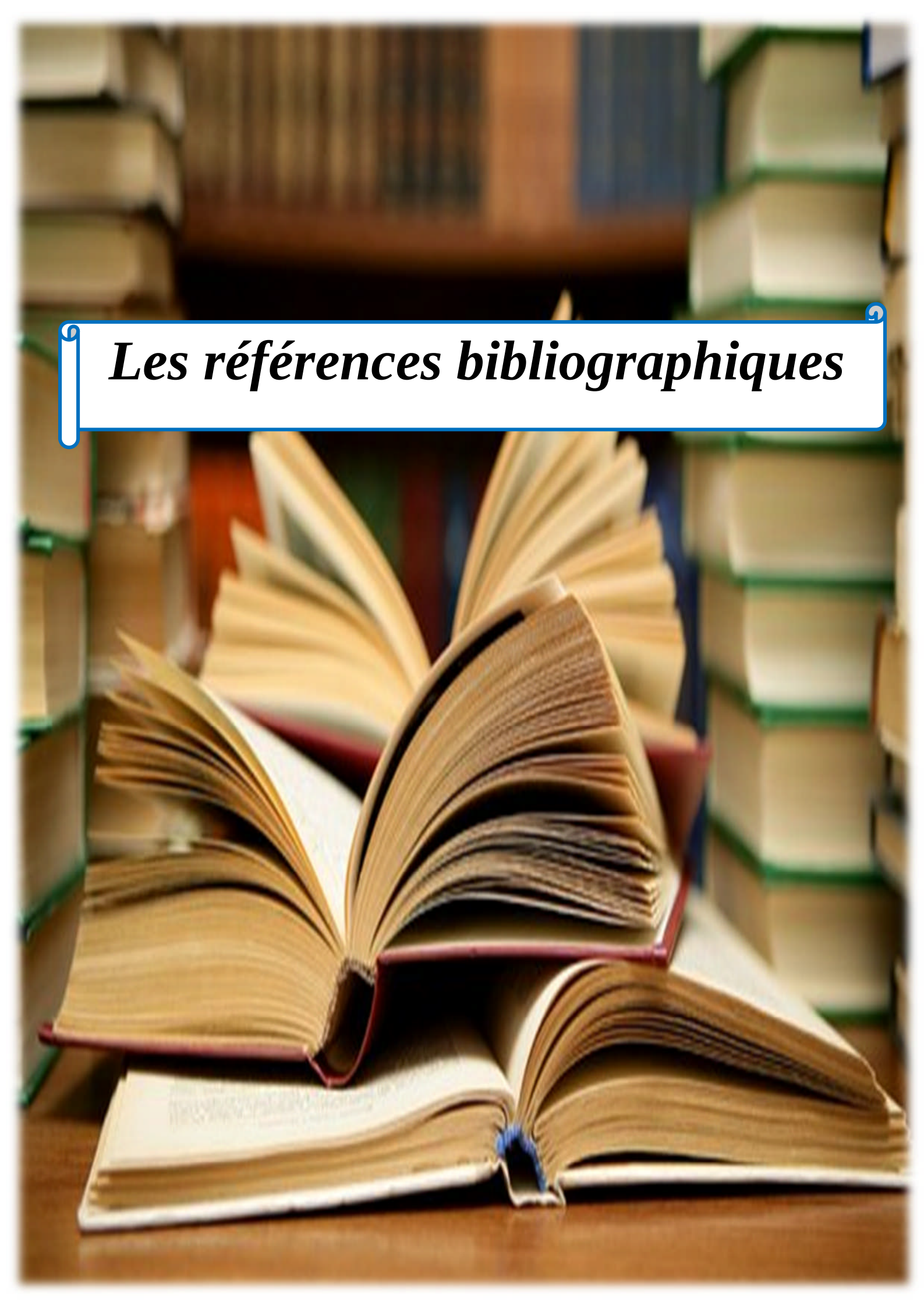
Nous avons procédé au dosage de certains conservateurs organiques, notamment le benzoate de Na et le méthyl parabène, dans un jus de fruits des plus consommé et des plus apprécié chez nous, en utilisant une technique d'analyse instrumentale des plus performante dite « **la chromatographie liquide à haute performance** ». L'appareillage requis pour cette méthode d'analyse est ainsi nécessairement plus sophistiqué, contrôlée par un ordinateur permettant la réalisation maximale de la qualité chromatographique, regroupant une extrême sensibilité, un grand pouvoir séparateur, une excellente rentabilité et productibilité, même une analyse rapide avec une bonne résolution.

Le dosage du benzoate de sodium, a révélé des résultats conformes aux normes requises et même très inférieures aux limites autorisées par le codex alimentarius. En effet, les doses enregistrées sont comprises entre 110 et 219.08 ppm alors que la norme est de 1000 ppm. Contrairement au méthyl parabène, on a enregistré des doses importantes allant jusqu'à 15,53 ppm, alors que la réglementation a interdit l'usage du méthyl parabène dans tous les aliments vu sa toxicité élevée. Nous pouvons dire que l'unité de production n'a pas respecté la réglementation quand à l'utilisation de ce conservateur dangereux donc ce qui constitue une infraction à la loi et une tromperie à l'égard du consommateur. De plus, la mention de méthyl parabène n'est pas signalée sur l'emballage de notre produit ce qui constitue une adultération et une infraction à la réglementation en vigueur.

Les conservateurs alimentaires constituent une classe d'additifs alimentaires indispensables car ils permettent de garder les aliments dans des conditions hygiéniques satisfaisantes permettant de limiter notamment des toxi-infections alimentaires. Cependant, leur action inhibitrice sur des processus biologiques induisent inévitablement des manifestations d'ordre toxiques d'où l'établissement des doses journalières admissibles (DJA) et des autorisations d'emplois adéquates permettant une gestion des risques dans l'équilibre « **Bénéfice/ Risque** ».

Dans le souci de préserver la santé du consommateur, il est important de souligner certains points importants à prendre en considération à savoir :

- ✓ La dénomination de vente du produit doit être accompagnée de la mention « **avec conservateur (s)** » pour les denrées alimentaires contenant un ou plusieurs conservateurs ;
- ✓ Augmenter la lisibilité de l'étiquetage, ceci est surtout utile pour les personnes souffrant d'intolérance / d'allergies vis-à-vis de ces conservateurs ;
- ✓ Sensibiliser le consommateur sur l'importance de lire l'étiquetage des denrées alimentaires lors de leur achat ;
- ✓ Le respect de la réglementation par les industriels lors de l'utilisation de ces substances dangereuses.



Les références bibliographiques

Références bibliographiques

AGUILO-AGUAYO I., SOLIVA-FORTUNY R., MARTIN-BLLOSO O. (2010). Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), pp 299-305.

ANDRE M. (2014). Additif alimentaire. Les fiches pratiques de la concurrence et de la consommation (FPCC), DGCCRF, pp1-3.

ANDRE M-L. (2013). Les Additifs Alimentaires: un danger méconnu. Editions jouvence, France, ISBN : 978-2-88911-405-4.

ANDRE V. (2015). La santé au quotidien avec les jus de fruits. *J. Am. Coll. Nutr.* 17,4 : pp 371-378, Paris.

AOUFI L. (2009). L'étiquetage et la traçabilité des denrées alimentaires. En vue de l'obtention du diplôme de post-graduation spécialisée en institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (INATAA), Constantine.

ASADPOOR M., ANSARIN M., NEMATI M. (2014). Amino acid profile as a feasible tool for determination of the authenticity of fruit juices. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 4(4): pp 359-362.

AUDIGIE C-L, DUPONT G., ZONSZAIN F. (1995). Principe des méthodes d'analyses biochimiques. BS & T, Tome 1. Doin, Paris, p 206, ISBN 2-7040-0747-0.

BAKIRI S. et M'ZALI M. (2013). Toxicité des additifs alimentaires. En vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie spécialisée en institut de médecine et pharmacie (UMMTO), Tizi-Ouzou.

BECKER L., BENDOUMA M., BONNART A., BOUSQUIERE J., DONZEAU A., GERVAIS C., HIERNAUX M., MAISON M., MATHIEU R., NAPOLITANO L., OBADIA E., PALERMO A. et THOLLET M. (2009). Les additifs alimentaires : le meilleur et le pire....Sous la direction d'E. Arab Tehrani et de C.Gaiani, Ensaia, pp 3-23.

BEDOUX G. (2014). Développer un produit stable : condition d'étude et tests de stabilité. In « Conception des Produits Cosmétiques : la formulation. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. p29-75.

BENAMARA S. (2003). Production des jus alimentaires: Technologies des industries agroalimentaires. Office des publications universitaires, Alger.

BERGER Y. (2009). Les additifs alimentaires : service de la consommation et des affaires vétérinaires (SCAV) Epalinges, canton de Vaud, p 30.

BEVERIDGE E. et HART A. (2013). The utilization for growth and the degradation of *p*-hydroxybenzoate esters by bacteria. *Int. Biodeterior. Bull*, **6**, 9-12.

BORREMANS M., VAN LOCO J., ROOS P., GOEYENS L. (2004). Validation of HPLC analysis of 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl and Benzyl 4-hydroxybenzoate (parabens) in cosmetic products, with Emphasis on Decision Limit and detection capability ; *Chromatographia* 59 (No. 1/2) ; pp 47-53.

Références bibliographiques

- BOSUND I. (2013).** The action of benzoic and salicylic acid on the metabolism of microorganisms. *Advances in Food Research*, 11, pp 331–353.
- BRAND W. (2014).** Ultrapure water of HPLC analysis: the role of ultrapure water. GIT Verlag, volume 17, SARTORIUS, Europe, pp 3-4.
- BRANEN A. L. (2002).** Food additives. University of Idaho, Mosco.
- BRANGER A., RICHER M.M. et ROUSTEL. (2007).** Alimentation et processus technologiques. Edition educagri, Ed. Dijon. ISBN: 978-2-84444-559-9.
- BRAT P. et CUQ B. (2007).** Transformation et conservation des fruits : aspects économiques et réglementaires. Edition les techniques de l'ingénieure, Paris.
- BRUZUAL-ALFONZO H., EUBELÉN M., CHAUMOUT G., WHITBURN S., ARNOLD T. (2010).** Chim-f-317 complements de chimie analytique: Rapport de laboratoire: dosage du parabène dans divers shampoings et savons. Université libre de Bruxelles. Université d'Europe (IRBI 3), Bruxelles.
- BURGOT G. et BURGOT J-L. (2011).** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales, 3^{ème} Edition. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- CAN NO, ARLI G, LAFCI Y. (2012).** A novel RP-HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate and sodium benzoate in soft drinks using C (18) - bonded monolithic silica column. *J Sep Sci.* 2012; 34: pp 221–222.
- CECCONI F. (2012).** Les additifs alimentaires et auxiliaires de fabrication. Creative commons (by-nc-sa), Vol 2.1, 1-3.
- CHAVANNE et BEAUDOIN. (2006).** « Chimie Organique Expérimentale », 5^{ème} Ed, Tec & Doc, Edition Belin, France, pp233-245.
- CHERIOT S. (2007).** Rôle des Produits de la Réaction de Maillard dans L'inhibition de L'oxydation Enzymatique des Phénols et des Lipides. THÈSE pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. Paris, France.
- CHIMA .(2000).** La chromatographie liquide : Comprendre les principaux mécanismes de la séparation chromatographique. Laboratoire de chimie analytique, Paris.
- CHIRCHESTER F.D. et TANNER F.W. (2013).** Antimicrobial food additives. Ed. by T.E.FURIA, CRC Press.
- CHOFFAT C. (2014).** Additifs alimentaires : entre bénéfices et risques. Tec & Doc. Edition Chariot d'or, Paris, pp 152-156.
- CLEMENT. (2005).** Introduction sur les techniques chromatographiques, Masson, Paris, pp 123-125.

Références bibliographiques

Codex alimentarius. (1995). Norme générale codex relative pour l'utilisation des conservateurs alimentaires dans les denrées alimentaires. Codex Stan (192-1995).

Codex alimentarius. (2005). Norme générale codex pour les jus et les nectars de fruits. Codex Stan 247.

COM. (2004). *“REPORTS OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE FOR FOOD”* Sur la consommation des additifs alimentaires dans l'union européenne publié en 2004, com (2004) 650 final.

Commission du Codex Alimentarius, Manuel de procédure, quinzième édition, 2006.

COOPER A. et BARRETT A. (2007). « Investigating the mixtures of certain food colours and a preservative on behaviour in children », Nutrition Clinic Metabolism, 68, pp 49-65.

DARBRE P.D. et HARVEY P.W. (2008). Paraben esters: Review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. J. Appl. Toxicol. 28, pp 561-578.

DECRET EXECUTIF N° 92-25 DU 13 JANVIER 1992 relatif aux *conditions et aux modalités D'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires.*

DE REYNAL B. et MULTON J.F. (2009). Additifs Alimentaires et Auxiliaires de Fabrications dans les Industries Agro-alimentaires. Tec & Doc, 4^{ème} Ed., Lavoisier, Paris, p165.

DIEZI M., BUCLIN T. et DIEZI J. (2011). Additifs alimentaires et troubles de l'attention/hyperactivité chez l'enfant. Paediatrica, Vol. 22, N°. 5.

DILLARD C.J. et GERMAN J.B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. J Sci Food Agric. 80: pp 1744-1756.

DIRECTIVE 89/107/CEE du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des états membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine », dans Journal officiel de l'Union européenne, no L 040, 1989, pp 14-15.

DOROTA K. (2014). Health safety of soft drinks: Contents, containers, and microorganisms. BioMed Research International, volume 2015, Art ID 128697, p 15.

EFSA JOURNAL. (2004). Rapport intitulé “Food additives in Europe 2004”, Statut of safety assessments of food additives presently permitted in the EU, Nordic Council of Ministers, TemaNord 2004:560, présenté à la commission par le Nordic Council of Ministers (Conseil nordique des ministres).

ELEFThERIADOU M., QUANTICK P., NOLAN M., AKKELIDOU D. (1998). “Factors Affecting Quality and Safety of Freshly Squeezed Orange Juice (FSOJ),” *Dairy Food Environ. Sanit.*, vol. 18, n°. 1, pp. 14-23.

Références bibliographiques

EL-ENANY N., EL-SHERBINY D., BELAL F. (2007). Spectrophotometric, spectrofluorometric and HPLC determination of desloratadine in dosage forms and human plasma. *Chem Pharm Bull.* pp 126-129.

ESCARGUEIL P. (2009). Définition, réglementation et consommation des additifs et auxiliaire technologique; in « Additifs Alimentaires et Auxiliaires de Fabrications dans les Industries Agro-alimentaires ». Tec & Doc, 4^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

FERNANDEZ-FERNANDEZ R., LOPEZ-MARTINEZ J.C., ROMERO-GONZALEZ R., MARTINEZ-VIDAL J.L., FLORES M.I.A., FRENICH A.G. (2010). Simple LC-MS determination of citric and malic acids in fruits and vegetables. *Chromatographia.* 72: pp 55-62.

FRAZIER W.C. et WESTHOFF D.C. (1988). Food Microbiology. McGraw-Hill Book Company-Singapore.

FREDOT E. (2012). Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. 3^{ème} Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

GOMEZ-ARIZA J.L., VILLEGAS-PORTERO M-J., BERNAL-DAZA V. (2005). Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC-MS/MS for authenticity assesment. *Analytica Chimica Acta* 540, pp 221-230.

HAAG T. et LONCRINI D.F. (1984). Esters of *para*-hydroxybenzoic acid. *Cosmet. Sci. Technol. Ser.* 1, 63–77.

HODGE. (2009). La toxicité du benzoate de sodium sur la santé publique. Tec & Doc, 2^{ème} Ed, Masson, Paris.

HUANG D., OU B., PRIOR R.L. (2005). The chemistry behind antioxydant capacity assays. *J Agric Food Chem.*53: pp 1841-1856.

ICH Topic Q2 Validation of Analytical Methods, the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: ICH Topic Q 2 A - Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95), 1995.

JACOB V. (2011). La chromatographie liquide haute performance (HPLC) : Présentation théorique de la HPLC, Salle de TP de Génie Analytique, IUT de chimie de Grenoble, France.

KADER A.A. (2008). Flavor quality of fruits and vegetables. *J Sci Food Agric.* 88: pp 1863-1868.

KAMOUN P. (1997). Appareil et Méthodes en biochimie et biologie moléculaire, Flammarion Médecine-Science, Paris, France, p253, ISBN 2-257-20109-4.

KUMAR N., SANGEETHA D., SUNIL REDDY P., PRAKASH L. (2011). A Validated Stability-Indicating RP-UPLC Method for Simultaneous Determination of desloratadine and sodium benzoate in Oral liquid Pharmaceutical Formulations, Scientia Pharmaceutica, Department of Chemistry, S.A.S., V.I.T. University, Vellore-632014, Tamilnadu, India.

Références bibliographiques

- LAFONT R. (2013).** « Techniques chromatographiques, Techniques spectroscopique », Méthodes physiques de la séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules, Université Pierre et Marie Curie, *J. Edov. Coll*, 158, pp15-24.
- LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUM J., WATTER P. (1977).** Microbiologie Appliquée. Douin Editeur, Paris.
- LEE J.H., LEE Y.B., SEO W.D., KANG S.T., LIM J.W., CHO K.M. (2012).** Comparative studies of antioxidant activities and nutritional constituents of persimmon juice (*Diospyros KaKi L. cv. Gapjubaekmok*). *Prev Nutr Food Sci*.17: pp 141-151.
- LONGET R. (2013).** Alimentation : les bons choix. Tec & Doc., Éditions Jouvence, France.
- LUCK E. et JAGER M. (1997).** Antimicrobial Food Additives. Characteristics, Uses and Effects. Springer-Verlag, Berlin.
- MA J.N., WANG S.L., ZHANG K., WU Z.G., HATTORI M., CHEN G.L., MA C.M. (2012).** Chemical components and antioxidant activity of the peels of commercial apple-shaped pear (fruit of *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli). *J Food Sci.* 77: pp 1097-1102.
- MACHEIX J-J., FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importances économiques. Volume 3, Tec & Doc, Ed Lausanne, Italy, ISBN 2-88074-625.
- MARTIN A. (2001).** « *Les risques alimentaires* », Dossiers d'enseignements. Cahier de nutrition et diététique.
- MARVIN C. et MASTER M.C. (2007).** HPLC A practical users Guide second Edition Wiley interscience, A John willey and sons, inc., Publication, 2007.
- MECHRI N. (2011).** Cours de chimie analytique « HPLC » faculté des sciences et techniques de Mohammedia-Département de chimie-Université Hassan II-Mohammedia-
- MOHAMED H., ABD EL-WAHAB F., SALAH MARAM G. (2012).** « *Toxicology and Industrial Health* », Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives.
- MORO BURONZO A. (2012).** Les incroyables vertus des conservateurs alimentaires. Tec & Doc, 5^{ème} Ed., Lavoisier, Paris, pp 183-185.
- MULTON J.L. (2009).** Additifs et Auxiliaires de Fabrication dans les IAA. Tec et Doc, Ed., Lavoisier, Paris.
- MUNIER R.L. (1972).** Principes des méthodes chromatographiques, Azoulay, Paris.
- NICKLAS T.A., BARANOWSKY J.C., CULLEN K., RITTENBERRY L., OLVERA N. (2014).** Family and child-care provider influences on preschool children's fruit juice and vegetable consumption. *Nutr. Rev.* 59,7: pp 224-235.

Références bibliographiques

NOLLET M.L. (2000). "Food analysis by HPLC", second edition, revised and expanded, hogeschool gent, Ghent, Belgium, marcel Dekker, INC New York.

Norme ISO 3534-2: Vocabulaire et symboles Partie 2: Statistique appliquée, ISO, Genève, 2006.

PANT M. (2012). « Development and validation of assay method for estimation of quetiapine fumarate by RP-HPLC », *Int. J. Pharm. Life Sci.*, vol. 3, no 7, pp. 1803-1804.

PARKE D.V. et LEWIS D.F.V. (2012). Safety aspects of food perservatives. *Fd. Add. Contam.*, 9, pp 561- 577.

PENCHEV P.I. (2010). Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en Génie des procédés et de l'environnement Spécialisé en Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

PÖLÖNEN I., TOIVONEN V. et MÄKELÄ J. (2012). Different combinations of formic: propionic and benzoic acids in slaughter offal preservation for feeding to fur animals. *Animal Feed Science and Technology*, 71, 197–202.

PRIOR R.L. et CAO G. (2000). Antioxydant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Hort Science*.35: pp 588-592.

QUATTRUCCI E. et MASCI V. (1992). Nutritional aspects of food preservatives. *Fd. Add. Contam.*, 9: PP 515-525.

RANDERATH R. (2012). Chromatographie sur couches minces, Gauthier-Villars, Paris, p1582.

RASTOGI S.C., SCHOUTEN A., DE KRUIJF N. et WEIJLAND J. W .(1995). Content of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis*, 32, 28–30.

ROSSET R. (1991). Chromatographie en phase liquide et supercritique, 3^{ème} Edition. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

ROUESSAC F. et ROUESSAC A. (2004). Analyse chimique: Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes, Dunod, 6^{ème} Edition, Masson, Paris, ISBN 2-10-048425-7, p459.

SCHERER R., RYBKA A.C.P., BALLUS C.A., MEINHART A.D., FILHO J.T., GODOY H.T. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chem.* 135: pp 150-154.

SEAMUS et HIGSON. (2003). Méthodes de détection des pesticides par la chromatographie liquide à haute pression (CLHP) dans les aliments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37 (4) : pp 1069-1071.

SINE J-P (2008). Module de Biochimie Analytique et de Biologie Moléculaire pour les Biotechnologies (S4B0600): Parcours Biochimie-Biologie Moléculaire, *Biochimie Analytique « Travaux dirigés »*, p107.

SKONG D. et WEST M. (2006). « Chimie Analytique », 7^{ème} Ed, Tec & Doc, Dunod, Paris, p459.

SKOOG D.A., HOLLER F.J., NIEMAN T.A. (2003). Principes d'analyse instrumentale. 1^{ère} Edition, Ed. De Boeck Université, p945.

SMAOUI S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de micro-organismes nouvellement isolés et identifiés. En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en génie de procédés et Environnement Spécialisé en Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), France.

TAVARES R.S. et al (2009). Parabens in male infertility-Is there a mitochondrial connection ? Reproductive Toxicologie, 27, pp 1-7.

TOUBAL L. et HADJOUT H. (2014). Contamination des aliments par les pesticides. En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en pharmacie Spécialisé en institut de médecine et pharmacie, UMMTO, Tizi-Ouzou.

UCKOO R.M., JAYAPRAKASHA G.K., BALASUBRAMANIAM V.M., PATIL B.S. (2012). Grapefruit (*Citrus paradise Macfad*) phytochemicals composition is modulated by household processing techniques. *J Food Sci.*77: pp 921-926.

UMBER. (2005). Development of simultaneous determination thiols, ascorbic acid and their oxidized forms using HPLC with electrochemical detection. *Sci. Aliments* 20: pp 237-252.

VALKOVA N., LEPINE F., VALEANU L., DUPONT M., LABRIE L., BISAILLON J.G., BEAUDET R , SHARECK F. et VILLEMUR R. (2001). Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. INRS-Institut Armand-Frappier Canada, Vol. 67, No. 6.

VAN DE WEGHE P (2012). Les additifs alimentaires (Nutraceutique-L3).Science Chimique de Rennes Equipe Produits Naturels, Synthèses, Chimie Médicinale, France.

VASANTHA RUPASINGHE H.P. et YU L.J. (2012). Emerging preservation methods for fruit juices and beverages. *Nova Scotia Agricultural College*; in: 'Food Additive'; In Tech, Canada.

VIAL J. (2002). Procédure de validation analytique de l'HPLC. Revue internationale d'analyses biochimiques, France.

VIERLING E. (2003). Aliments et boissons. Filières et produits, 2^{ème} Ed., Doen, Paris.

VIERLING E. (2005). Aliment et Boisson : Technologie et aspect réglementaire. Doin , 3^{ème} Ed., Scérén Crdp Aquitaine, France .

WANG H., PROVAN G.J., HELLIWELL K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chemistry*, 87, pp 307 – 311.

Références bibliographiques

WHO (World Health Organization). (2012). “General Principles Governing *the Use of Food Additives*”, series N°129.

❖ Sites internet :

- ✚ ANONYME 1. <http://www.naturalia.fr/docs-les-jus-de-fruits-21.htm>.
- ✚ ANONYME 2. www.afssa.fr: Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- ✚ ANONYME 3. www.ifn.asso.fr: Institut français pour la nutrition.
- ✚ ANONYME 4. Source des données nutritionnelles : [Table de composition nutritionnelle des aliments Ciqua 2013-2013- Licence Ouverte \(www.data.gouv.fr\)](http://www.data.gouv.fr).
- ✚ ANONYME 5. <http://informationnutritionnelles.fr/aliments>
- ✚ ANONYME 6. (<http://www.fao.org>)
- ✚ ANONYME 7. www.UNIJUS.santé.com/union-national-interprofessionnelle-des-jus-de-fruits.html : Union National Interprofessionnelle des jus de fruits.
- ✚ ANONYME 8. <http://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-aliments/jus-fruits/composition>
- ✚ ANONYME 9. www.synpa.org : Syndicat national des producteurs d’additifs et ingrédients de la chaîne alimentaire.
- ✚ ANONYME10. https://www.overblog.com/Quelle_est_lutilite_du_benzoate_de_sodium-1095203942-art319571.html.
- ✚ ANONYME 11. <http://www.eufic.org/article/fr/artid/conservateurs-duree-vie-aliments-securite/>
- ✚ ANONYME 12. www.mincommerce.gov.dz

ANNEXES

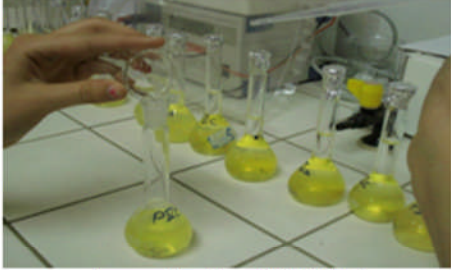
Annexes

Annexe 1 : Etapes de préparation des gammes de dosage des deux conservateurs:

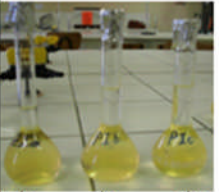
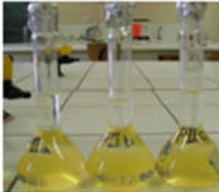
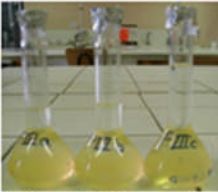
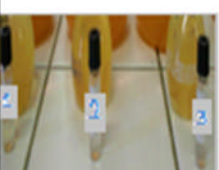
La 1 ^{ère} fabrication (PI)	La 2 ^{ème} fabrication (PII)	La 3 ^{ème} fabrication (PIII)	La 4 ^{ème} fabrication (PIV)	La 5 ^{ème} fabrication (PV)
				
				
PI1 PI2 PI3	PII1 PII2 PII3	PIII1 PIII2 PIII3	PIV1 PIV2 PIV3	PV1 PV2 PV3
 Prélever 5 ml du jus dans chaque lot				

Dilution 1/10





les verser dans chaque fiole de 50 ml
Ajuster avec « diluant 1 » jusqu'au trait de jauge

				
PI1 PI2 PI3	PII1 PII2 PII3	PIII1 PIII2 PIII3	PIV1 PIV2 PIV3	PV1 PV2 PV3
				
1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12	13 14 15

Annexes

Annexe 2 : Préparation de la phase mobile :



Annexe 3 : Détermination des aires de pics des 15 échantillons analysés (benzoate de sodium)

Echantillons analysés :	Aire de pic ($\mu\text{V} \cdot \text{min}$) :
Benzoate de sodium ech 01.lcd	485814
Benzoate de sodium ech 02.lcd	1036919
Benzoate de sodium ech 03.lcd	966593
Benzoate de sodium ech 04.lcd	984590
Benzoate de sodium ech 05.lcd	726183
Benzoate de sodium ech 06.lcd	504772
Benzoate de sodium ech 07.lcd	919011
Benzoate de sodium ech 08.lcd	486718
Benzoate de sodium ech 09.lcd	254802
Benzoate de sodium ech 10.lcd	236724
Benzoate de sodium ech 11.lcd	297772
Benzoate de sodium ech 12.lcd	243461
Benzoate de sodium ech 13.lcd	258766
Benzoate de sodium ech 14.lcd	259504
Benzoate de sodium ech 15.lcd	146092

Annexes

Annexe 4 : Détermination des aires de pics des 15 échantillons analysés (méthyl parabène)

Echantillons analysés :	Aire de pic ($\mu\text{V}\cdot\text{min}$) :
Methyl paraben ech 01.lcd	1960
Methyl paraben ech 02.lcd	1998
Methyl paraben ech 03.lcd	2127
Methyl paraben ech 04.lcd	2522
Methyl paraben ech 05.lcd	3534
Methyl paraben ech 06.lcd	2582
Methyl paraben ech 07.lcd	2199
Methyl paraben ech 08.lcd	1942
Methyl paraben ech 09.lcd	2386
Methyl paraben ech 10.lcd	3141
Methyl paraben ech 11.lcd	2948
Methyl paraben ech 12.lcd	2167
Methyl paraben ech 13.lcd	196652
Methyl paraben ech 14.lcd	2135
Methyl paraben ech 15.lcd	0

Annexes

Annexe 5 : Norme générale de *Codex alimentarius* (Codex STAN 192-1995).

CONSERVATEURS MATRICES	Acide benzoïque et ses sels	Méthyl paraben	Ethyl paraben	Propyl paraben	Acides sorbique et ses sels
Jus de fruits.	(+) 1000 ppm	-	-	-	(+) 1000 ppm
Concentrés pour jus de fruits.	(+) 1000 ppm	-	-	-	(+) 1000 ppm
Nectars de fruits.	(+) 1000 ppm	-	-	-	(+) 1000 ppm
Contrés pour nectars de fruits.	(+) 1000 ppm	-	-	-	(+) 1000 ppm
Boisson aromatisées.	(+) 600 ppm	(+) 500 ppm	(+) 500 ppm	-	(+) 500 ppm
Yaourts aux fruits.	(+) 300 ppm	(+) 120 ppm	(+) 120 ppm	-	(+) 1000 ppm
Fruits secs.	(+) 800 ppm	(+) 800 ppm	(+) 800 ppm	-	(+) 500 ppm
Fruits conservés en vinaigre, à l'huile ou en saumure.	(+) 1000 ppm	(+) 250 ppm	(+) 250 ppm	-	(+) 1000 ppm
Confiture, marmelade et gelées.	(+) 1000 ppm	(+) 250 ppm	(+) 250 ppm	-	(+) 1000 ppm
Pate à tartiner a base de fruits.	(+) 1000 ppm	(+) 1000 ppm	(+) 1000 ppm -	-	
Fruits confits.	(+) 1000 ppm	(+) 1000 ppm	(+) 1000 ppm	-	(+) 500 ppm
Préparation à base de fruits incluant les pulpes, les coulis et les nappages.	(+) 1000 ppm	(+) 800 ppm	(+) 800 ppm	-	(+) 1000 ppm
Desserts à base de fruits et à base d'eau aromatisée.	(+) 1000 ppm	(+) 800 ppm	(+) 800 ppm	-	(+) 1000 ppm
Cidre poiré.	(+) 1000 ppm	(+) 200 ppm	(+) 200 ppm	-	(+) 500 ppm
Fruits cuits.	(+) 1000 ppm	-	-	-	(+) 1200 ppm
Produits à base de fruits fermentés	(+) 1000 ppm	(+) 800 ppm	(+) 800 ppm	-	(+) 1000 ppm

