

Le glycérol un alcool pas comme les autres...

Dr Christophe CORDELLA,
Ingénieur de Recherche AFSSA, Unité Abeille
AFSSA SOPHIA-ANTIPOLIS, 105 ROUTE DES CHAPPES

F-06902 SOPHIA-ANTIPOLIS CEDEX.
☎ 04.92.94.37.14 @ c.cordella@afssa.fr

Il y a un peu plus de deux cent ans, en 1779, Carl W. Scheele, un chimiste suédois, découvrait un nouveau liquide sirupeux en chauffant de l'huile d'olive et de la litharge^{1*}. Qui aurait pu lui dire que cette nouvelle substance chimique deviendrait aussi indispensable tant il y a de domaines d'applications pour ce tri-alcool dont la dénomination IUPAC est Propane-1,2,3-triol. Ce nouveau composé à la saveur sucrée fut appelé *glycérol* (du grec *glukeros*, « doux »). Plus tard, des études montrèrent que le glycérol constitue le composé principal des graisses et huiles sous la forme de ses esters appelés *glycérides*. Aujourd'hui, le glycérol, trivialement appelé glycérine, est à l'origine d'une grande variété d'utilisations domestiques et industrielles.

A travers quelques définitions physico-chimiques et la présentation de quelques aspects pharmaceutiques, biochimiques et alimentaires, l'article qui suit permet de visiter ou de revisiter les champs d'applications du glycérol dans la vie de tous les jours. Nous aborderons notamment l'intérêt du dosage de cet alcool pas tout à fait comme les autres dans les aliments.

Sous forme pure, le glycérol de formule $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$, est un liquide sans couleur, sans odeur, translucide et visqueux. Il est entièrement soluble dans l'eau et bien sûr dans les alcools, faiblement soluble dans les autres solvants organiques tels que l'éther ou le dioxane, et insoluble dans les hydrocarbures. A basse température, le glycérol peut former des cristaux qui tendent à fondre vers 17.9°C. Sous forme liquide, le glycérol possède une température d'ébullition de 290°C à la pression atmosphérique. Sa densité est de 1.26 (il est donc plus lourd que l'eau) et son poids moléculaire est de 92 g.mol⁻¹.

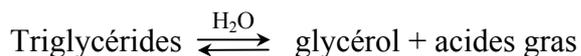
LE GLYCÉROL ET L'INDUSTRIE CHIMIQUE

Le glycérol joue un rôle important dans de nombreuses industries. Il est extrêmement utilisé pour ces propriétés émoullientes et apaisantes dans nombre de préparations pharmaceutiques et cosmétiques. C'est aussi un solvant de préparation des teintures et encres. On l'utilise également dans la préparation de sirops médicamenteux (ex. : la Théophylline) préconisés dans le traitement de certains problèmes respiratoires tels que l'asthme et les bronchites asthmatiques.

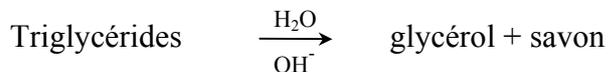
Comme il est très hygroscopique (il absorbe l'eau de l'air), le glycérol est utilisé comme humectant et constitue un ingrédient important pour prévenir le dessèchement des pommades et crèmes. De saveur douce, le glycérol est un agent sucrant (pouvoir sucrant égal à 70% de celui du glucose) intéressant à incorporer dans les préparations. Ses qualités de conservation font du glycérol un bon stabilisateur et un auxiliaire de solvant de choix dans des préparations faisant intervenir également de l'eau ou des alcools. Il est aussi utilisé comme plastifiant pour étendre la diffusion de l'enrobage des comprimés et des granules. Le glycérol sert par ailleurs de lubrifiant, d'antigel, entre dans la confection de la dynamite (nitroglycérine) et peut même être une source de nutriment pour la croissance de certaines cultures bactériennes utilisées pour la production d'antibiotiques.

Dans la nature, on trouve le glycérol sous forme de différents esters appelés glycérides. Selon le nombre de groupements hydroxyyles estérifiés, il existe les mono-, di- et triglycérides. Ces derniers constituent la matière grasse : graisses, huiles, margarines. Les graisses sont constituées d'acides gras saturés, les huiles d'acides gras insaturés (notamment l'acide oléique, acide gras en C18) et les margarines sont des émulsions de graisse et d'eau (quelques %).

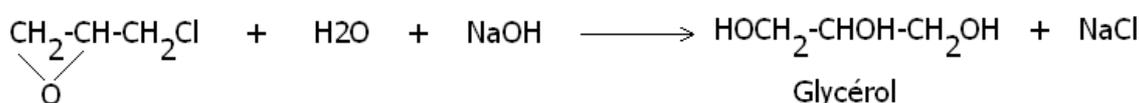
Industriellement, le glycérol est un sous-produit de l'hydrolyse des triglycérides avec production d'acides gras selon la réaction suivante :



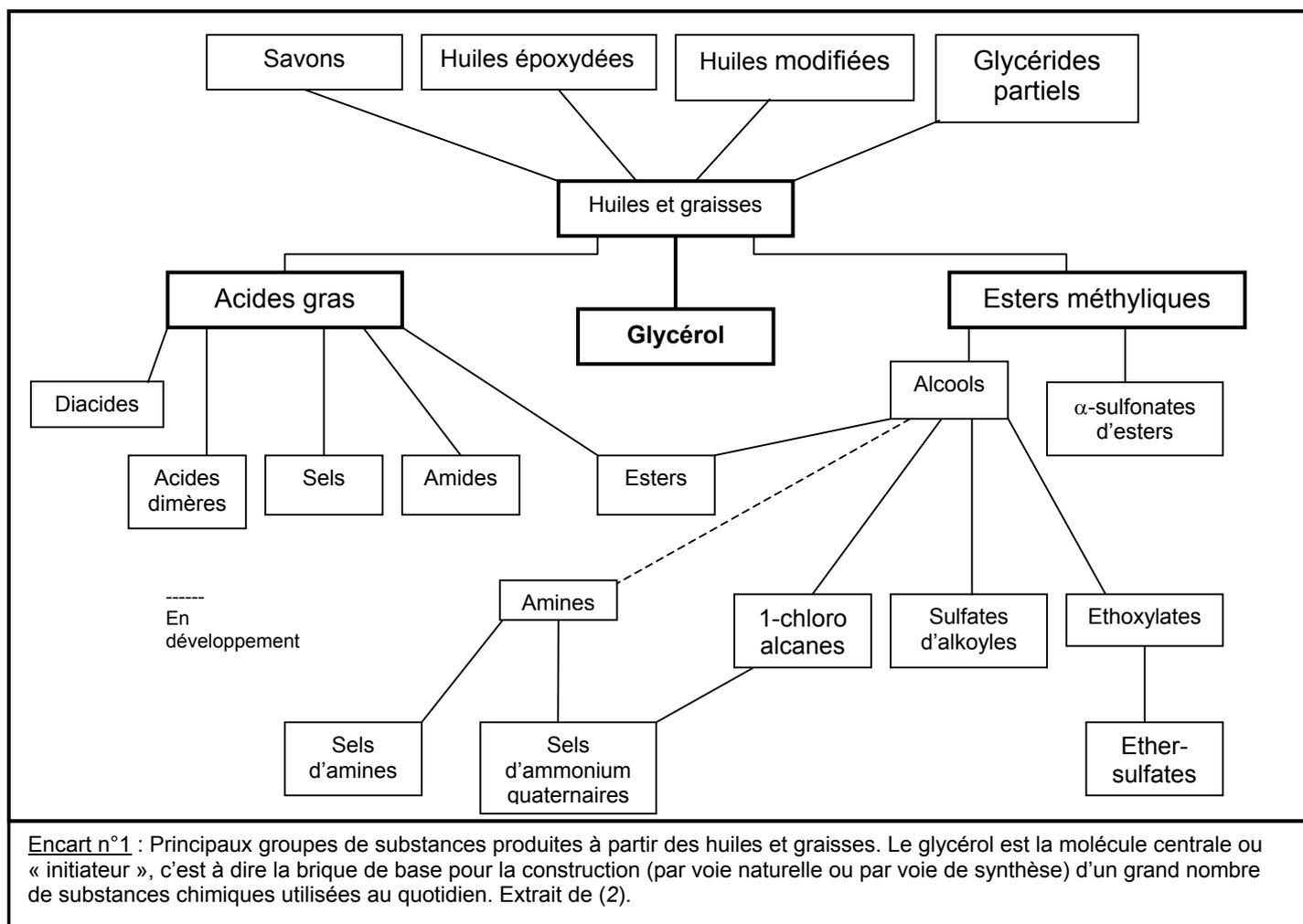
L'hydrolyse des triglycérides en milieu basique (saponification) produit également du glycérol et des savons.



De manière générale, toute hydrolyse de matière grasse produit du glycérol, mais ce n'est pas la seule voie possible pour obtenir du glycérol. Deux réactions notamment conduisent à la formation de glycérol. La première est issue de l'industrie pétrolière à partir du propylène (obtenu par craquage des oléfines du pétrole). La deuxième implique l'hydrolyse industrielle de l'épichlorhydrine^{2*} en milieu basique selon la réaction (1):



L'hydrolyse en milieu basique permet l'ouverture du cycle oxygéné et élimination du chlore qui est remplacé par un groupe OH.



Le glycérol est au centre de l'industrie des huiles et des graisses (voir encart n°1). Moins de 20% de la production mondiale de corps gras (environ 4.5 Mt) sont réservés aux usages non alimentaires, et relèvent de ce fait d'un secteur particulier de la chimie industrielle, la **lipochimie** ou **oléochimie**. Produit dans le monde à raison de 450 000 t/an (y compris la part issue de la fabrication des savons), le glycérol est un composé chimique dont le monde moderne ne peut plus se passer.

LE GLYCÉROL ET L'INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE

Présent naturellement (produit par des ferments tels que *Saccharomyces cerevisiae*- levure de bière) ou artificiellement ajouté lors des procédés de fabrication (comme additif alimentaire E422), le glycérol est un composé d'importance de l'industrie agroalimentaire. Son dosage et son suivi dans les aliments (les jus de fruits (3), les vins (4,5), les huiles végétales (6,7), la bière, le lait, le miel...) et dans des produits para-alimentaires tels que les dentifrices (8) ou les feuilles de café (9) permettent d'évaluer leur qualité olfactive et sensorielle.

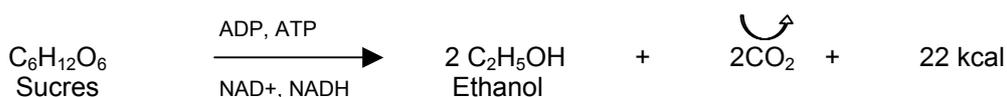
De manière générale, le glycérol s'avère être un bon indicateur de la qualité puisqu'il est issu, la plupart du temps, de la fermentation des sucres entrant dans la composition des aliments (voir encart n°2). Par conséquent, il rend compte de l'état de conservation des ingrédients qui composent l'aliment et indique l'état d'avancement des processus de dégradation. Dans certains cas, son dosage permet de mettre en évidence une adultération. C'est le cas des vins par exemple (10) où l'on s'attache à vérifier que le taux de glycérol ne dépasse pas 6 à 10% de la teneur en éthanol. Dans le cas contraire, le vin peut être considéré comme adultéré. Généralement, la raison principale de cet ajout de glycérol est qu'il donne plus de « corps » au vin.

Dans l'industrie du lait, il permet la détermination indirecte de la teneur en triglycérides des produits tels que les yoghourts, il est dosé après hydrolyse enzymatique totale des triglycérides.

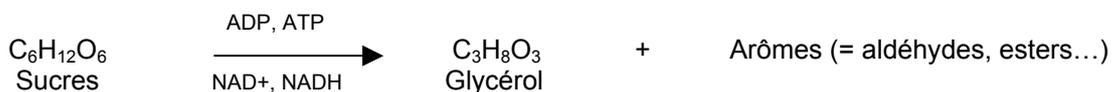
Le glycérol est issu de la réduction des sucres fermentescibles tels que le glucose, le mannose et le fructose par des levures ou des moisissures. C'est Pasteur, le premier vers 1860 qui établit le lien entre le phénomène de fermentation et l'activité de micro-organismes vivants dans un milieu privé d'oxygène.

Deux voies de fermentation alcoolique sont possibles : la voie principale et la voie secondaire.

La voie principale métabolise 90% des sucres en éthanol et en dioxyde de carbone et la réaction s'accompagne d'un fort dégagement de chaleur.



La voie secondaire ou fermentation glycopyruvique transforme les sucres en glycérol et en de nombreux composés aromatiques (aldéhydes, esters).



Durant cette fermentation alcoolique, le CO₂ représente 95% des produits formés, le glycérol compte pour 3 à 5%, l'acide succinique 0,5% et le reste correspond à des produits secondaires tels que le butane-3-diol (0,5%).

Encart n°2 : La fermentation est un phénomène microbien qui se produit au cours de la maturation de nombreux aliments tels que le pain et le vin.

Dans le cas du miel, produit que nous connaissons bien au laboratoire de l'AFSSA Sophia-Antipolis puisque nous l'étudions ainsi que d'autres produits de la ruche depuis plus de 20 ans, une fermentation peut apparaître lorsque le taux d'humidité est supérieur à 18% ou bien si le miel a subi un traitement thermique trop élevé lors des procédés d'extraction et de conditionnement. Une présence importante de levures osmophiles ou plus généralement de ferments, témoin d'une dégradation de la qualité ou de manipulations réalisées dans des conditions hygiéniques insuffisantes, sont également une cause de la fermentation des miels. Il en résulte alors l'apparition croissante de glycérol dans les échantillons. Contrairement à d'autres produits alimentaires, il n'y a pas dans le cas du miel de réglementation officielle concernant la teneur maximale de glycérol autorisée permettant de garantir un certain niveau de qualité du produit^{3*}. Cependant, dans la pratique on constate que lorsque le taux de glycérol est inférieur à 100mg/kg le processus de fermentation est imperceptible. Entre 200 et 300 mg/kg des anomalies organoleptiques apparaissent et au-delà de 300 mg/kg le miel a vraiment fermenté et ne devrait plus être consommé en tant que tel. Habituellement, on considère qu'un miel de très bonne qualité a un taux de glycérol inférieur à 50 mg/kg.

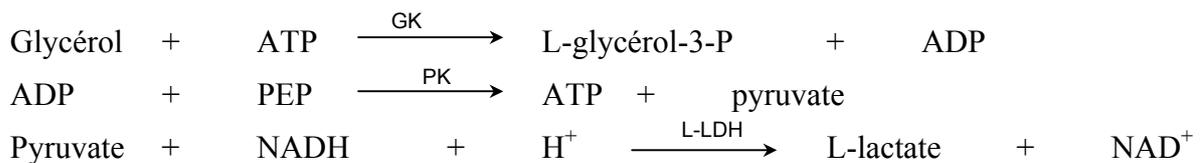
LES TECHNIQUES DE DOSAGES

Actuellement, il existe principalement deux types de techniques^{4*} pour doser le glycérol que ce soit dans les aliments ou dans d'autres matrices d'intérêt. Le premier type de technique auquel on peut faire appel est la chromatographie liquide dont le principe est basé sur la séparation des composés organiques constituant l'échantillon à analyser. Cette séparation est suivie d'une détection plus ou moins spécifique de ces mêmes composés (exemple : détection massique par spectrométrie de masse, détection ampérométrique ou détection réfractométrique (11)). A titre d'exemple on peut citer la chromatographie ionique à ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD = High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection) qui associe donc un appareil de chromatographie liquide et un système de détection utilisant les propriétés d'oxydoréduction des composés chimiques analysés dans les aliments. D'ordinaire, la HPAEC-PAD est utilisée pour le dosage simultané des sucres dans les aliments (12), mais cette technique a vu son champs d'application s'étendre rapidement ces dernières années (13). Du point de vue électrochimique notamment, le glycérol a des propriétés d'oxydoréduction voisines de celles des sucres. Après une petite mise au point, il peut aisément être dosé par HPAEC-PAD (14,15). Le résultat se présente, comme dans toute chromatographie, sous la forme d'un chromatogramme sur lequel un des pics enregistrés correspond à la présence de glycérol (Cf. figure 1). La quantification se fait alors grâce à un étalonnage qui permet de relier la surface des pics enregistrés au cours d'une analyse à la concentration des substances dosées.

FIGURE 1.JPG

Figure 1 : Dosage du glycérol avec d'autres sucres et/ou sucre-alcools dans le chewing-gum par chromatographie ionique à ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD).

Le deuxième type de techniques est la spectroscopie UV-Visible qui repose sur le principe d'absorption de la lumière par les composés chimiques. Tout le spectre de la lumière n'est pas absorbé mais seulement certaines longueurs d'onde. Cependant, chaque longueur d'onde retenue est spécifique d'une famille de molécules présentes dans l'échantillon. Dans ce domaine, on pourra procéder par lecture directe de l'absorbance après préparation des échantillons (il s'agira essentiellement d'une étape de clarification au moyen de différents solvants tels que l'acétone ou l'acide trichloroacétique) afin d'éliminer la matière protéique de l'échantillon. Puis par des lectures à diverses longueurs d'onde (notamment entre 510 et 590 nm) on pourra en déduire l'absorbance due au glycérol (16). Cette détermination plutôt laborieuse a été abandonnée au profit des méthodes enzymatiques pour lesquelles des kits de dosage sont disponibles commercialement depuis quelques années. L'avantage du dosage enzymatique est qu'il peut être très spécifique d'un composé donné. La mise en œuvre est par ailleurs très commode. Concernant le glycérol, le dosage repose sur la réaction suivante :



GK = glycerokinase

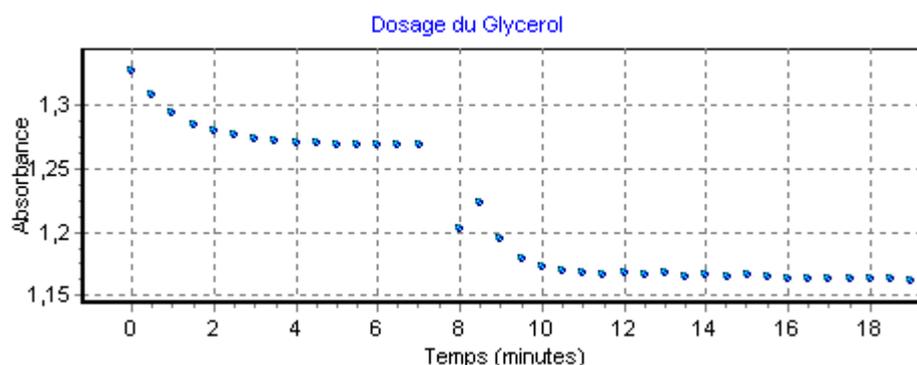
PK = phosphokinase

PEP = phosphoénolpyruvate

La méthode est spécifique du glycérol et la limite de détection (à 340 nm) est de 0,4 mg/l.

Ce principe est applicable à de nombreuses molécules d'intérêt (17), dans une multitude de matrices alimentaires, il suffit de choisir judicieusement les outils enzymatiques en fonction du substrat à doser. Dans le cas du miel par exemple, plusieurs auteurs ont appliqué ces méthodes enzymatiques au dosage de l'acide D-gluconique (18), du galactose et du lactose (19), de l'acide L-malique (20) et du glycérol (21).

Le résultat se présente sous la forme d'une courbe de décroissance enzymatique enregistrée par le spectrophotomètre à une longueur d'onde donnée (en l'occurrence pour le glycérol la longueur d'onde choisie préférentiellement dans les travaux de (21) est de 340 nm)



A partir de cette courbe, et pour chaque échantillon, la détermination du taux de glycérol se fait en calculant l'écart entre le point de rupture de la courbe et la droite (des moindres carrés) asymptotique passant par les points terminaux. Cette détermination est réalisée pour les échantillons ainsi que pour le blanc analytique. Les quantités obtenues sont introduites dans une formule prenant en compte l'ensemble des paramètres analytiques tels que le volume d'eau de dilution, le volume de préparation enzymatique, la masse molaire du

glycérol, la masse d'échantillon pesée etc...Après calcul, le taux de glycérol mesuré dans les échantillons est donné en mg/kg.

VERS L'AUTOMATISATION DES CALCULS

A l'usage, nous avons constaté que la méthode était efficace, relativement facile à mettre en oeuvre et fiable. Cependant, le traitement des courbes analytiques pour un grand nombre de déterminations est le facteur limitant. Aussi, nous a développé au laboratoire de l'AFSSA de Sophia-Antipolis, en collaboration avec le laboratoire Arômes-Synthèses-Intéactions de l'Université de Nice, un logiciel d'acquisition et de traitement automatisé des données spectroscopiques issues du dosage du glycérol dans les miels (22). Cette application permet de s'affranchir de l'étape laborieuse de traitement des courbes UV-Visibles de décroissance enzymatique. Les résultats obtenus garantissent la répétabilité des calculs effectués sur les courbes et permet de réaliser la détermination simultanée du taux de glycérol dans plusieurs séries d'échantillons.

Ce rapide tour d'horizon montre, à travers divers exemples, l'importance au quotidien, du glycérol pour notre monde moderne. Nous avons vu aussi que le glycérol n'est pas une substance inventée par l'homme, elle est la brique initiale de composés importants du corps humain et des êtres vivants : les glycérides. Cette multitude de rôles que joue cette molécule de structure relativement simple provient sans doute de son caractère « bicéphale » qui la partage chimiquement entre les sucres et les alcools. Le glycérol ressemble aux sucres par sa saveur et aux alcools par ces propriétés chimiques (dues aux groupements alcools primaires et secondaires), ces caractères particuliers font de lui un alcool pas tout à fait comme les autres.

NOTES DE BAS DE PAGE

1* La litharge est un oxyde de plomb, jaune. C'est une substance cristalline, insoluble dans l'eau, et utilisée notamment dans la fabrication du verre et de certaines peintures.

2* L'épichlorhydrine est une substance liquide à la température ordinaire. Sa production mondiale est de l'ordre de 0.7 Mt/an. C'est un produit modérément toxique. Elle est à la base de la fabrication industriellement de plusieurs substances telles que le glycérol, les résines époxydes et les éthers glycidiques.

3* Cela tient sans doute au fait que le glycérol ne présente pas de danger de point de vue toxicologique contrairement à l'HMF (5-hydroxy-2-méthulfurfural) qui est un autre critère permettant d'évaluer la qualité des miels. Ce dernier est toxique et la législation a fixé un seuil maximal de 40 mg/Kg pour cette molécule dans les miels.

4* Ces deux familles de techniques ne sont bien sûr pas spécifiquement réservées au dosage du glycérol.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Epichlorhydrine. *In Chimie Industrielle*. Perrin, R. et Scharff, J.-P., Ed. Dunod, Paris, 1999, p562. ISBN 2 10 004753 1.
2. Utilisations industrielles des huiles et graisses. *In Chimie Industrielle*. Perrin, R. et Scharff, J.-P., Ed. Dunod, Paris, 1999, p734-741. ISBN 2 10 004753 1.
3. Linget, C. *et al.* (1998), *Analisis*, 26(1), 35-39.
4. Luca, G.C. *et al.* (1998), *Analytical Chimica Acta*, 366(1), 193-199.
5. Rangel, A.O.S.S. *et al.* (2000), *Analytical Chimica Acta*, 416(2), 205-210.
6. Jie, N.Q. *et al.* (1998), *Analytical Chimica Acta*, 359(1-2), 87-92.
7. Darnoko, D. *et al.* (2000), *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 23(15), 2327-2335.
8. Svanberg, M. and Birkhed, D. (1991) *Caries Res.*, 25, 449-453.
9. Majerus, R. *et al.* (1985), *GIT Fachz. Lab.*, 10, 978-979.
10. Recherche d'addition frauduleuse de glycérol dans les vins. Laboratoire de la DGCCRF : bilan 1998. Laboratoire de Bordeaux.
11. Calull, M. and Birkhed, D. (1992), *Journal of Chromatography*, 590, 215-222.
12. Ralapati, S. and LaCourse, W. Carbohydrates and other electrochemically active compounds. *In Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Ed. W.J. Hurst (2002), CRC Press, London. p307-362.
13. Cataldi, T.R.I.; Campa, C. *et al.* (1998) *Food Chemistry*, 62(1), 109-115.
14. Cataldi, T.R.I.; Margiotta, G. *et al.* (1998) *Food Chemistry*, 62(1), 109-115.
15. Cataldi, T.R.I.; Centonze, D. *et al.* (1997) *Analytical Chemistry*, 69, 4842-4848.
16. Pons, A. *et al.* (1981) *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods*, 4, 227-231.
17. Méthodes enzymatiques pour l'analyse agroalimentaire. CA 02/10-98. Roche Diagnostics, 2 av. du Vercors, BP 59, 38242 Meylan Cedex, France.
18. Mato, I. *et al.* (1997), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3550-3553.
19. Val, A. *et al.* (1998), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1381-1385.
20. Mato, I. *et al.* (1998), *Food Chemistry*, 62(4), 503-508.
21. Fernandez-Muino, M.A. *et al.* (1996), *Journal of Sciences and Food Agriculture*, 71, 141-144.
22. Cordella, C. *et al.* (2003), *Trends in analytical Chemistry*, 22(2), 115-122.