**Chapitre 4 : Dosage des lipides**

**Introduction :**

Les lipides qu’ils soient apparent comme dans le beurre et les huiles ou dissimulés comme dans le lait, fromage, la viande ou les œufs, jouent un rôle important dans l’alimentation :

* **Rôle nutritionnel :** Tout d’abord grâce à l’apport énergétique 8.5 cal/g d’acide gras essentiel et de vitamines liposolubles A, E, K, D.
* **Rôle organoleptique :** Ensuite par leurs contribution à la texture et de la sapidité des aliments ainsi que par leurs emploi culinaire.

Les lipides sont des biomolécules insolubles dans l’eau, solubles dans les solvants organiques, cette définition englobe 2 grandes classes :

1. **‐** Lipides saponifiables (simples ou homolipides) :Dérivés naturels résultants de combinaison d’AG (acide gras) avec un alcool ou une amine, sont des lipides ternaires uniquement constitués de C, H, et O. Ce sont les lipides neutres. Les triacylglycérols (TAG) sont très majoritaires sur le plan alimentaire ;
2. **‐** Lipides insaponifiables (isopréniques et icosanoïdes):Constituent un ensemble de molécules très diverses regroupées ici en raison de leur caractère hydrophobe : ce sont les substances lipoïdes. Ils sont des précurseurs communs, L’isoprène est un hydrocarbure diphylétiques à 5 carbones
3. **‐** Lipides complexes ou hétérolipides :Sont constitués de C, H et O auxquels viennent s’adjoindre P et/ou N. Ces nouveaux atomes donnent des groupements polaires sur la molécule, conduisant ainsi aux lipides amphiphiles. Les phosphoglycérolipides (PGL) et les sphingolipides (SL) appartiennent à ce groupe ;

Les acides gras possèdent tous une longue chaine hydrocarbonée et un groupement carboxylique terminal CH3-(CH2)n-COOH, la chaine hydrocarbonique peut être saturée ou insaturée (présente une ou plusieurs doubles liaisons).

Les acides gras différent donc entre eux par la longueur de la chaine et le nombre et la localisation des doubles liaisons éventuellement :

**a. Acides gras saturés (AGS):**

Aucune double liaison, leur formule brute CnH2nO2, leur symbole n : 2<n<32, leur formule développé est **CH3‐(CH2)n‐2‐COOH.**

**b. Acides gras insaturés (AGI):**

Caractérisés par la présence de double liaison,

* Une double liaison : AG monoinsaturé
* Plusieurs doubles liaisons : Ag polyinsaturé.

**c. Glycérides (Acylglycérole) :**

Appelés encore graisses neutres, c’est la classe la plus importantes. Ce sont les esters de glycérol et d’acides gras.

Le glycérol est un trialcool qui présente 3 positions d’estérification : 2 sont identiques sur l’alcool I : α‐ά et 1 sur l’alcool II : β

****

**Figure : structure de glycérol**

Selon :

‐ Nature des AG qui estérifient la fonction alcool de glycérol on parlera de :

* Acylglycérole homogène : Si les 3 AG sont identiques ;
* Acylglycérole hétérogène (mixte) : 3 AG sont différents.

‐ Nombre et position d’estérification on parlera de :

* α ou β monoacylglycérol ;
* (α‐ά) ou (α‐β) : Diacylglycérol ;
* (α, β, ά) : Triacylglycérol homogène ou hétérogène.

**d. Phosphoglycérides (Glycéro‐phospholipides) :**

* La formule générale est :

****

Selon la nature de radicale X :

X=H : Acide phosphatidique ;

X= choline : Acide phosphatidylcholine (lécithine) ;

X= éthanolamine : Acide phosphatidyléthanolamine (céphaline) ;

X= sérine : Acide phosphatidylsérine ;

X= inositol : Acide phosphatidylinositol

**Remarque** : Si à une fonction de glycérol on remplace l’acide gras par un aldéhyde à long chaine carbonée on obtient un plasmogène.

**e. Sphingolipides et glycolipides:**

La formule générale est :

****

Si H\* = hexose : Glycolipide ; Si H\* = galactose : Cérébroside

**I. Méthodes de dosage des lipides**

**I.1.Dosage des lipides totaux (ou matière grasse totale)**

L’extrait lipidique est définit comme étant l’ensemble des substances reprise par un solvant organique anhydre après extraction à l’alcool bouillante. Cet extrait contient en plus des lipides proprement dits, des substances qui les accompagnent comme les stérols, les hydrocarbures et certaines vitamines liposolubles.

La plupart des méthodes de dosage des lipides exploitent ces propriétés physiques pour extraire les lipides des aliments dans le but de mesurer leur concentration.

* 1. **Méthode de Goldfisch**

La méthode de Goldfisch est une méthode gravimétrique, puisqu’on pèse l’échantillon au début et la matière grasse en fin de l’analyse. Elle est utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides ou séchés.

Principe: Le produit est pesé puis placé dans une cartouche de cellulose ou une capsule poreuse d’alundum (oxyde d’aluminium, Al2O3) de l’extracteur Goldfish.

L’échantillon est extrait en continu par l’éther éthylique en ébullition, ou l’éther de pétrole, qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse, retourne dans un récipient placé sous le porte-échantillon. Comme seul le solvant peut s’évaporer de nouveau, la matière grasse s’accumule dans le récipient jusqu’à ce que l’extraction soit complète. Une fois que l’extraction est terminée, le solvant est évaporé et la matière grasse est pesée.



 **Figure:** Extracteur Goldfish

* 1. **Méthode de Soxhlet**

La méthode Soxhlet est une méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides ou séchés. Il est à signaler que cette méthode d’extraction est moins rapide et moins efficace que les méthodes de Goldfisch.

Principe: L’aliment est pesé puis placé dans une cartouche de cellulose. La cartouche de cellulose est perméable au solvant et à la matière grasse qui y est dissoute. Le solvant qui se trouve dans le ballon de chauffage remonte vers la chambre d’extraction pour 5 à 10min puis retourne au ballon. L’échantillon est extrait en semi-continu par un solvant (exemple : éther éthylique, hexane, éther de pétrole) en ébullition qui retombe goutte-à-goutte dans la chambre d’extraction et qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s’évaporer de nouveau, la matière grasse s’accumule dans le ballon jusqu’à ce que l’extraction soit complète. Une fois l’extraction terminée, le solvant est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la teneur en lipides est mesurée par poids de diminution de l’échantillon ou directement par le poids des lipides extraits. Si l’échantillon contient plus de 8-10% d’humidité, le séchage est recommandé.



**Figure :** Extracteur Soxhlet

**1.3.Méthode de Mojonnier**

La méthode de Mojonnier est une méthode de référence pour la détermination de la matière grasse dans les produits laitiers. Le test de Mojonnier ne nécessite pas l’étape de séchage de l’échantillon et peut être utilisé pour les produits liquides et solides. Le traitement acide ou basique ou les deux combinés peuvent être appliqués également dans cette méthode.

Principe : Le produit laitier est mesuré puis mis dans le flacon de Mojonnier (Figure ??). Le produit est dissout dans la phase aqueuse contenant de l’hydroxyde d’ammonium (NH4OH, densité 0,8974) et de l’alcool éthylique. La matière grasse est extraite à l’aide d’un solvant organique immiscible avec l’eau, composé d’éther éthylique et d’éther de pétrole. Les solvants d’extraction sont évaporés et la matière grasse est pesée.

À cause de la teneur très variable en matière grasse dans les produits laitiers, la quantité d’échantillon pesée, le nombre d’extractions et les volumes de solvants utilisés doivent être ajustés en fonction de chaque type de produits laitiers.



**Figure :** Flacon de Mojonnier

Rôles du réactif et des solvants

* **Hydroxyde d’ammonium (NH4OH) :** Déstabilise la micelle lipidique, neutralise l’acidité du produit laitier, réduit la viscosité, facilitant ainsi l’action des solvants, et prévient la formation de gel.
* **Alcool éthylique à 95% :** Facilite l’extraction ; l’alcool étant miscible avec l’éther, brise les liaisons entre les protéines et les phospholipides qui sont inclus dans la matière grasse et facilite la séparation de la phase aqueuse de la phase organique.
* **Éther éthylique :** Dissout la matière grasse et la garde en solution. L’éther peut inclure également un peu d’eau contenant de petites quantités de solides non gras qui peuvent causer des résultats erronés.
* **Éther de pétrole :** Ce solvant est un mélange d’hydrocarbures, sert à éliminer de la solution d’éther éthylique toute trace d’eau pouvant contenir des solides non gras.

**1.4. Méthode de Babcock**

La méthode de Babcock est une méthode officielle utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les produits laitiers. Cette méthode volumétrique est peu coûteuse et rapide, prend un temps d’analyse d’environ 45min, mais peu précise. De plus, les résultats obtenus par cette méthode sont, en moyenne, légèrement plus élevés que ceux obtenus par la méthode de Mojonnier.

Principe : Le produit laitier est pesé (ou pipeté pour le lait), puis dissout avec l’acide sulfurique (H2SO4 ; densité = 1,82) qui digèrent les protéines, génèrent de la chaleur et libèrent les lipides qui remontent à la surface de la solution. Par addition d’eau et centrifugation, la matière grasse est dirigée dans la partie graduée de la bouteille de Babcock (Figure ??). On mesure, à 57°C (55-60°C), la hauteur d’une colonne de gras sur une échelle graduée en pourcentage massique (% m/m) de matière grasse.



**Figure:** Bouteilles de Babcock pour les lipides du lait (a), de la crème (b) et du fromage (c).

**II. Isolement et dosage des constituants lipidiques à partir d’un extrait lipidique total**

Le dosage et l’isolement n’ont de sens évidemment que s’ils sont pratiqués sur un extrait lipidique total obtenu dans des bonnes conditions.

L’extrait lipidique total peut être constitué par des phosphatides, des glycérides, des acides gras libres, des esters de cholestérol et des substances insaponifiables.

1. **Isolement des phosphatides et dosage par leurs acides gras**

L’extrait lipidique total est dessous dans un faible volume de benzène, de chloroforme ou d’éther anhydre et les phosphatides sont précipités par addition d’acétone anhydre ( 9 vol pour 1 vol. de benzène, de chloroforme ou d’éther) en présence de quelques gouttes d’une solution saturée de MgCl2 dans l’alcool absolu. Après un séjour de 6 heurs dans la glacière, la totalité de phosphatides a précipité ; on centrifuge à 4200 Tr/mn pendant 20 mn. Pour purifier encore les phosphatides, il est bon d’effectuer une deuxième précipitation.

Le précipité est ensuite saponifié par addition d’une solution 2N de KOH dans l’alcool à 95° (25 cm3 par 1 g de précipité) pendant 2heures au bain marie bouillant. Après addition d’eau pour abaisser la teneur en alcool du milieu, on acidifie avec HCl au 1/3 et on extrait les acides gras par 3 extractions à éther sulfurique. Les phases éthérés sont réunies, séchées à l’alcool absolu et les acides gras sont repris par de l’éther de pétrole d’anhydre (P.E 30- 50 °C) au dessus d’un filtre amiante-sable. Après évaporation on les pèse à poids constant.

Remarque : on peut évaluer les phosphatides par leur phosphore soit à partir de l’extrait lipidique total, soit à partir du précipité de phosphatides. Après minéralisation, on dose le P par méthode colorimétrique par exemple.

1. **Séparation des acides gras libres :**

Après avoir précipité les phosphatides, le liquide acétonique qui surnage contenant des acides gras libres, glycéride, esters de cholestérol et insaponifiables, est évaporé à sec. On reprend les lipides par de l’éther de pétrole et on fait 2 extractions à la potasse N/10 dans l’alcool 50°, puis 3 extractions de la phase hydroalcoolique par de l’éther de pétrole. La phase hydroalcoolique est mise à évaporer (réduction de 1/3 du volume) et après acidification avec HCl au 1/3 on extrait les acides gras comme précédemment.

1. **Séparation quantitative des glycérides (et esters de cholestérol) de l’insaponifiables total (technique de LEMELAND)**

La phase d’éther de pétrole est évaporée. On saponifie à reflux avec une solution de KOH 2N dans l’alcool à 95° (25 cm3 par 1 g de précipité) pendant 2heures au bain marie bouillant. On ajoute ensuite HCl normal, eau et alcool à 95°, pour obtenir un milieu N/10 dans l’alcool à 50°, seul milieu permettant de séparer les acides gras de l’insaponifiables. Si l’on utilise à 25 cm de KOH au départ, on ajoute 40 cm3 de HCl N, 26 cm3, 2 d’alcool à 95° et 8 cm3, 8 d’eau.

On fait bouillir à reflux pendant 20 mn encore, puis on extrait l’insaponifiable par l’éther de pétrole 30°-70°. Les acides gras appartenant aux glycérides (et aux esters de cholestérol s’il s’agit de tissus animaux) passent dans la phase hydroalcoolique ou il forme des savons, on extrait comme précédemment, l’insaponifiable reste dans l’éther de pétrole. Après évaporation et séchage, on reprend par l’éther de pétrole anhydre ; on le sèche et l’on pèse à poids constant.

1. **Dosage du cholestérol :**
* **Méthode gravimétrique :** c’est la méthode classique de Windous-Caminade, on dose le cholestérol sous forme de complexe avec la digitonine ( ???) ; on évalue le cholestérol libre dans l’extrait lipidique total et le cholestérol total dans l’insaponifiable total obtenu après saponification.
* **Méthodes colorimétrique :** elles sont utilisées pour de petite quantité de cholestérol (cholestérol estérifié ou total dessous dans le chloroforme donne en présence d’acide sulfurique la réaction colorée de LIEBER-MANN-BURCHARD.

**II- Caractérisation chimique d’une huile ou d’une graisse**

**1- Acidité**

Au cours de la conservation d’une matière grasse, il se produit l’hydrolyse chimique ou enzymatique des triglycérides et libération d’acides gras ou formation secondaire d’acides à courtes chaînes. La mesure de l’acidité est un moyen pour déterminer le degré d’altération d’une matière grasse. Ce paramètre est utilisé comme un indicateur de qualité par exemple, le choix d’une huile pour la friture. Quelques fois l’acidité limite pour l’huile de friture est prise à 1% (2mg KOH/g).

Principe :

L’huile à analyser est mise en solution dans l’alcool éthylique à température avoisinante l’ébullition. Le titrage est réalisé par une solution d’hydroxyde de potassium (KOH) jusqu’au virage de la couleur de l’indicateur coloré, la phénolphtaléine, au rose. La neutralisation se fait selon la réaction suivante :



1. **Indice de saponification (Is)**

L’indice de saponification est défini comme étant la quantité de base nécessaire pour saponifier une quantité donnée d’huile ou de graisse. Elle est exprimée en mg de KOH requise pour saponifier 1g d’échantillon. Il peut renseigner sur le taux de glycérides.

Principe :

La matière grasse est saponifiée par traitement avec une base (KOH, ex. 0,52N) sous chauffage pendant 1 heure. L’excès d’hydroxyde de potassium (KOH) est titré par une solution d’acide chlorhydrique (HCl, ex. 0,52N) en présence d’un indicateur coloré, la phénolphtaléine.



1. **Insaponifiables**

Les matières insaponifiables d’un corps gras sont l’ensemble des substances qui ne sont pas susceptibles d’être modifiées par la réaction de saponification et restent insolubles dans l’eau. Les insaponifiables sont formés par les stérols, les pigments (caroténoïdes), les vitamines liposolubles (vitamines E, A et K) et les hydrocarbures.

Principe :

Après saponification d’un corps gras par la potasse, la solution contient en plus de la potasse (en excès), des savons et du glycérol, des constituants insaponifiables qui sont récupérés par un solvant non polaire tel que l’hexane. Leur quantification se fait après évaporation de solvant apolaire.

1. **Indice d’iode (Ii)**

L’indice d’iode mesure le degré d’insaturation d’une matière grasse. Il est défini comme étant le nombre de grammes d’iode fixés par 100g de lipide. Plusieurs méthodes normalisées ont été développées pour la détermination de l’indice d’iode, les méthodes Wijs et Hanus étant les plus utilisées. Dans la méthode de Wijs, le monochlorure d’iode (ICl) est utilisé comme agent d'halogénation, alors que dans le procédé d’Hanus, le monobromure d'iode (IBr) est l'agent d'halogénation.

L’indice d’iode est utilisé pour caractériser une matière grasse (degré d’insaturation), suivre le processus d’hydrogénation et mesurer le degré d’oxydation des lipides, car au cours de l’oxydation les insaturations diminuent.

Principe

L’échantillon est dissout dans le tétrachlorure de carbone (CCl4), le chloroforme ou le cyclohexane (moins toxique), la solution de monochlorure d’iode (ICl) ou de monobromure d’iode (IBr) est ajoutée en excès. L’halogène se fixe sur les doubles liaisons (Réaction 1). La solution d’iodure de potassium est ajoutée pour réduire l’ICl non fixé (Réaction 2). L’iode (I2) libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (Réaction 3) jusqu’à décoloration de la couleur due à l’iode (I2). Une solution d'amidon est ajoutée pour avoir une couleur bleu.



**ICl :**Monochlorure d’iode; **KI :** Iodure de potassium; **KCl :** Chlorure de potassium; **Na2S4O6 :** Sodium tetrathionate; **Na2S2O3:** Thiosulfate de sodium; **NaI :** Iodure de sodium.

1. **Indice de peroxyde (Ip)**

L’oxydation des lipides est la cause majeure de leur détérioration, et les produits formés par la réaction de l’oxygène avec les acides gras insaturés sont les premiers produits initiateurs de cette dégradation.

L’indice de peroxyde est parmi les caractéristiques chimiques le plus utilisé pour la détermination de degré d’altération d’un corps gras. L’indice de peroxyde est le nombre de milliéquivalent gramme d’oxygène actif par kilogramme de corps gras (meq g d’O2/kg de lipide).

Principe : Le traitement d’un corps gras dans un milieu acide par la solution d’iodure de potassium (KI) permet la libération d’iode (I2) après réaction avec les peroxydes (Réaction 3). L'iode formé est ensuite titré, habituellement avec une solution de thiosulfate de sodium, qui est oxydé en un tétrathionate (Réaction 4). Une solution d'amidon est ajoutée comme un indicateur coloré qui se combine avec l’iode pour former un produit bleu. A la fin du dosage, le mélange réactionnel est décoloré.

Réactions de formation d’un peroxyde et de sa transformation en hydroperoxyde :

Réaction 1 : R + O2 → R-OO

Réaction 2 : R + H → R-OOH

Réaction d’iodure de potassium avec le peroxyde en milieu acide :

Réaction3 : R-OOH + 2KI + 2CH3-COOH→ R-OH + 2CH3-COOK+ H2O + I2

Réaction de l’iode libéré sur le thiosulfate de sodium :

Réaction4 : I2 + 2Na2S2O3 → 2NaI + Na2S4O6

1. **Méthodes de détermination de la stabilité oxydative des lipides**

L’oxydation d’une huile peut survenir durant le procédé d’extraction et au cours de la conservation des huiles. Les réactions d’oxydation conditionnent ainsi la durée d’utilisation optimale d’une huile. La résistance à l’oxydation peut être déterminée par des tests de vieillissement accéléré (Test de Swift, test de Schaal, Rancimat, etc.). La résistance à l’oxydation est souvent déterminée par la mesure du temps d’induction de l’oxydation.

**a. Test Schaal**

Ce test consiste à oxyder la matière grasse dans une étuve portée à 60°C. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par la mesure de l'indice de peroxyde sur des prélèvements faits toutes les 4, 8, ou 24h. Cette méthode présente l'avantage de se rapprocher des conditions réelles de stockage (cas des flacons transparents d'huiles conservés à la lumière du jour et à température ambiante).

**b. Test au Rancimat**

Ce test est très utilisé pour évaluer la stabilité oxydative des matières grasses. La spécification de TIR (Temps d’Induction Rancimat, exprimé en heures) correspond au temps pendant lequel la matière grasse résiste à l’oxydation. Le principe du test consiste à accélérer le vieillissement de la matière grasse par décomposition thermique à 110°C sous un flux intensif d'air. Les produits de dégradation qui se forment sont expulsés par le flux et transférés dans la cellule de mesure remplie d’eau distillée. Le temps d'induction est déterminé par conductimétrie et correspond au TIR.