

MÉTHODES D'ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

Plan

Introduction

I. Composition des aliments

II. Méthodes de dosage de l'eau et des solides totaux

III. Méthodes de dosage des métaux lourds et des éléments minéraux

IV. Méthodes de dosage des glucides

V. Méthodes de Dosage des protéines

VI. Méthodes de dosage des lipides

VII. Méthodes de dosage des arômes

VIII. Méthodes de Dosage des facteurs anti-nutritionnels

IX. Analyses organoleptiques des denrées alimentaires

X. Méthodes de dosage des vitamines

IV. Méthodes de dosage des glucides

Dosage des glucides (oses et osides) :

Les glucides

Les glucides forment un groupe de substances naturelles et synthétiques, composées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils ont été longtemps désignés sous le nom d'hydrates de carbone : dans la plupart d'entre eux, en effet, l'hydrogène et l'oxygène se trouvent dans les mêmes proportions que dans l'eau : en $(H_2O)_m$.

Ils comprennent essentiellement :

- des sucres simples réducteurs : **les oses** ;
- des sucres complexes : **les osides** dont l'hydrolyse libère un ou plusieurs oses.

Les oses sont eux-mêmes caractérisés par la coexistence, dans la même molécule, d'une fonction réductrice, aldéhydrique ou cétonique, et de plusieurs fonctions alcools.

Les sucres simples ou oses portent le nom d'aldoses ou de cétooses selon que la fonction réductrice est située en fin de chaîne ou sur un chaînon intermédiaire. Ils sont par ailleurs classés d'après le nombre d'atomes de carbone contenus dans la molécule.

Les osides sont subdivisés en : holosides et hétérosides.

- Holosides, si tous les produits d'hydrolyse sont des oses : ils sont classés suivant le nombre d'oses obtenus.
- Hétérosides, si les oses ne sont pas les seuls produits d'hydrolyse. La fraction non glucidique est nommée aglycone.

IV. Méthodes de dosage des glucides

Dosage des oses et des osides :

Méthodes physiques:

- **Polarimétrie:** Fondée sur le pouvoir rotatoire des sucres (loi de Biot: $\alpha = \alpha^\circ * l * C$)
- **Réfractométrie:** l'indice de réfraction d'une solution aqueuse de sucres augmente avec la concentration ($n = n^\circ + k * C$)
- **Viscosimétrie:** la viscosité d'une solution aqueuse de sucres varie avec la concentration de la solution.

Toutes ces méthodes sont rapides mais:

- Elles ne donnent des résultats satisfaisants que si les solutions sont concentrées.
- Elles ne sont pas spécifiques.



Elles sont donc surtout utilisées en industrie.

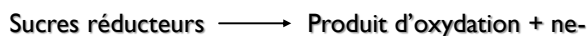
IV. Méthodes de dosage des glucides

Dosage des oses et des osides :

Méthodes chimiques:

Méthodes réductimétriques:

Elles sont fondées sur le pouvoir réducteur des oses et osides, pouvoir lié à la présence d'une fonction hémiacétalique libre. Ce pouvoir réducteur s'exprime en milieu basique à chaud.



Cela implique donc la préparation d'un étalon ou d'une gamme d'étalonnage, ou bien l'utilisation d'une table, toutes les expériences devant être réalisées dans les mêmes conditions opératoires strictement respectées. On distingue:

- Des méthodes par comparaison (Fehling)
- Des méthodes à relation empiriques (Bertrand)
- Des méthodes colorimétriques

On peut également classer ces méthodes selon la nature de l'oxydant:

- Méthodes cuprimétriques (Fehling, Bertrand, Luff...)
- Méthodes mercurimétriques (Baudoin-Lewin)
- Méthodes ferriques (Hagedorn-jensen)
- Méthodes par réduction de composés organiques (ex: DNS)
- Méthodes par réduction de composées organiques (ex: DNS)

IV. Méthodes de dosage des glucides

Dosage des oses et des osides :

Méthodes chimiques:

Méthodes furfuraliques:

Les oses ayant un nombre de carbone au moins égales à 5 sont déshydratés en milieu acide acétique concentré et à chaud en dérivés furfuraliques, ces dérivés pouvant ensuite se condenser avec des phénols ou des amines cycliques pour former des composés colorés qui absorbent spécifiquement à une longueur d'onde donnée.

Exemple: la méthode de Dubois et al., (1956) (apparition d'une coloration jaune-orangé dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en oses dans la solution testée.

Dosage des oses et des osides :

Méthodes chimiques:

Méthodes furfuraliques: la méthode de Dubois et al., (1956)

Principe: elle repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

Réactifs :

- Phénol 5 % dans l'eau distillée.
- Acide sulfurique concentré à 95% de pureté et de densité $d = 1,84$

Mode opératoire :

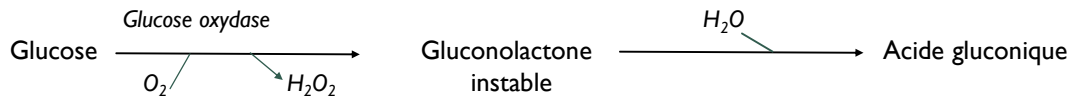
- Ajouter à 1 ml d'échantillon, 1 ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré.
- Agiter et laisser reposer 10 min à température ambiante.
- Incuber au bain marie à 30°C pendant 20 min.
- Mesurer la coloration jaune orangé à 490 nm, les valeurs obtenues sont traduites en concentrations de glucose par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établies.

IV. Méthodes de dosage des glucides

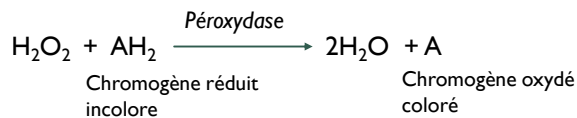
Dosage des oses et des osides :

Méthodes enzymatiques:

➤ Dosages du glucose par la méthode à la glucose oxydase



L'évolution de cette réaction est suivie grâce à une réaction indicatrice, catalysée par une peroxydase.



➡ On suit l'évolution de l'absorbance à la longueur d'onde maximale de ce composé

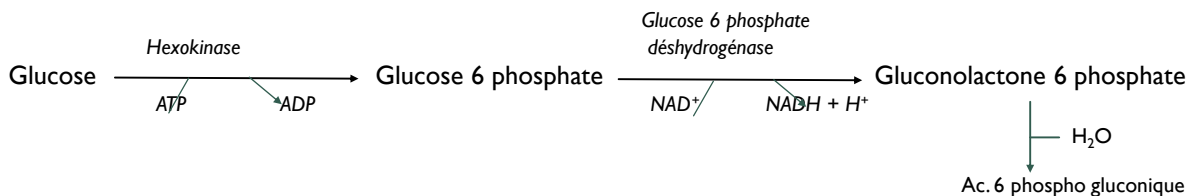
Le protocole repose sur l'utilisation direct d'un Kit dosage du glucose à la Glucose Oxydase / Peroxydase

IV. Méthodes de dosage des glucides

Dosage des oses et des osides :

Méthodes enzymatiques:

➤ Dosages du glucose par la méthode à l'hexokinase



➡ On suit l'évolution de l'absorbance à la longueur d'onde maximum de NADH

IV. Méthodes de dosage des protéines

Dosage des protéines totales :

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes : sensibilité, interférents, réponse plus ou moins différente selon la composition en acides aminés Le choix d'une méthode dépend donc du contexte.

Méthodes colorimétriques les plus courantes pour la détermination de la concentration en protéines sont:

- Dosage des protéines par la méthode du Biuret
- Dosage des protéines par la méthode du Bradford
- Dosage des protéines par la méthode du Lowry

IV. Méthodes de dosage des protéines

Dosage des protéines totales :

Dosage des protéines par la méthode dite du Biuret (détaillé)

Principe:

Pour toute chaîne polypeptidiques contenant au moins 2 liaisons peptidiques, les liaisons peptidiques forment, en milieu très alcalin, un complexe coloré avec les ions Cu^{2+} . Si on met en œuvre un réactif standardisé, en excès, on peut ainsi doser les protéines par colorimétrie à 540 nm. Le réactif standardisé utilisé est appelé réactif de Gornall (la concentration en Cu^{2+} , en OH^- est standardisée, il contient du KI : 1,5 g de CuSO_4 , 5 H_2O pour 6 g de tartrate double de sodium et de potassium et 30 g de NaOH et 1 g de KI).

Modes opératoires:

- Echantillon à doser ou étalon qsp 1 mL avec une solution de NaCl à 9 g/L.
- 0,8 à 10 mg de protéines par tube. (Les dilutions éventuelles des solutions protéiques sont réalisées en NaCl à 9 g/L.)
- réactif de Gornall 4 mL (réactif très stable) ;
- homogénéiser, attendre 30 minutes à l'obscurité et lire au spectrophotomètre à 540 nm.

IV. Méthodes de dosage des protéines

Dosage des protéines totales :Dosage des protéines par la méthode dite du Biuret

Méthode	Biuret
Référence	Gornall et al. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751
Réactif	Le biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$)
Groupements réactifs	Formation d'un complexe pourpre avec la liaison peptidique en présence de cuivre à pH basique
λ mesure	545 nm (ou 300 nm)
Sensibilité	Faible (seuil = 100 μg)
Rapidité et complexité	Méthode simple et moyennement rapide
Interférence	Dosage influencé par les autres solutés

IV. Méthodes de dosage des protéines

Dosage des protéines totales :Dosage des protéines par la méthode dite du Bradford

Méthode	Bradford
Référence	Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248 - 256
Réactif	Le bleu de Coomassie (s'adsorbe sur le verre des cuves qu'il faut nettoyer fréquemment)
Groupements réactifs	Réaction avec l'Arg et, dans une moindre mesure, avec l'His, la Lys et les acides aminés aromatiques
λ mesure	595 nm (bleu de Coomassie seul : 465 nm)
Sensibilité	Elevée (seuil = 1 μg)
Rapidité et complexité	Méthode simple et très rapide
Interférence	Dosage peu influencé par la présence d'autres molécules sauf les détergents et les bases fortes

IV. Méthodes de dosage des protéines

Dosage des protéines totales :

Dosage des protéines par la méthode dite du Lowry

Méthode	Lowry
Référence	Lowry et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 251
Réactif	Le biuret et le réactif de Folin-Ciocalteu (phosphomolybdate et phosphotungstate - 1927)
Groupelements réactifs	Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec la Tyr et le Trp et, dans une moindre mesure, avec la Cys, l'His et la liaison peptidique
λ mesure	745 nm
Sensibilité	Elevée (seuil = 1 μ g)
Rapidité et complexité	Méthode moyennement simple et moyennement rapide
Interférence	Dosage fortement influencé par les autres solutés.

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Les lipides sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques, tel l'éther éthylique. 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.

- Méthode Soxhlet
- Méthode Goldfisch
- Méthode Babcock
- Méthode Mojonier

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Méthode Soxhlet

La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

Principe de la méthode:

L'aliment solide est pesé et placé dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par de l'éther éthylique à ébullition (P.E. 35 C°) 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, l'éther est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée.

les capsules de cellulose sont perméables au solvant et à la matière grasse qui y est dissoute. Ces capsules sont jetables.

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Méthode Goldfisch

La méthode Goldfisch est une variante (appareillage différent) de la méthode Soxhlet. C'est une méthode gravimétrique utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés.

Principe de la méthode:

L'aliment solide est pesé et placé dans une capsule de cellulose ou un contenant poreux d'alundum.

L'échantillon est extrait en continu par de l'éther éthylique à ébullition (P.E. 35 C°) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans un bêcher placé sous le contenant d'alundum. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le bêcher jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé et la matière grasse pesée.

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Méthode Babcock

La méthode Babcock est une méthode officielle utilisée pour la détermination des lipides dans les produits laitiers. Cette méthode volumétrique est rapide et peu coûteuse, mais moins précise que la méthode de référence Mojonner. De plus, les résultats obtenus par cette méthode sont, en moyenne, légèrement plus élevés que ceux obtenus par la méthode Mojonner.

Principe de la méthode:

Le produit laitier pesé (ou pipeté pour le lait) est dissout dans l'acide sulfurique dont l'action sert à libérer la matière grasse qui remonte à la surface de la solution. Par addition d'eau et centrifugation, la matière grasse est dirigée dans la partie graduée du butyromètre. On mesure, à une température de 57 °C, la hauteur d'une colonne de gras sur une échelle graduée en % P/P de matière grasse.

Matériel:

- tube Babcock
- centrifugeuse Babcock
- bain thermostaté à 57 °C

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Méthode Babcock

Particularités de la méthode:

- Pour les laits, on utilise un butyromètre gradué jusqu'à 8% en divisions de 0,1%. Pour le prélèvement de l'échantillon, on utilise une pipette de 17,6 ml, ce qui équivaut à 18,0 g de lait. La précision de l'analyse est de $\pm 0,1\%$.
- Pour les laits écrémés, on utilise un butyromètre spécial gradué jusqu'à 0,5% en divisions de 0,01%. Le prélèvement de l'échantillon est de 18,0 g (17,6 ml).
- Pour les autres produits laitiers liquides (crèmes, crèmes glacées, etc), on utilise un butyromètre 0-20% (divisions de 0,25%) ou 0-50% (divisions de 0,5%). Le prélèvement de l'échantillon est de 9,0 g. La précision de l'analyse est de $\pm 0,25\%$ ou 0,5% selon le butyromètre utilisé.
- Pour les produits laitiers solides, tels les fromages, on utilise un butyromètre Paley 0-20% ou 0-50%. Le prélèvement de l'échantillon est de 9,0 g. La précision de l'analyse est de $\pm 0,25\%$ ou 0,5% selon le butyromètre utilisé.

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Méthode Mojonnier

La méthode Mojonnier est la méthode de référence pour la détermination de la matière grasse dans les produits laitiers. Cette méthode gravimétrique, une adaptation de la méthode Roëse-Gotlieb, utilise un appareil spécial, l'appareil Mojonnier.

Principe de la méthode:

Le produit laitier est pesé puis dissout dans la phase aqueuse contenant de l'hydroxyde d'ammonium 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. La phase organique est décantée dans un plat, le solvant évaporé et la matière grasse pesée.

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Composantes de l'appareil Mojonnier:

- balance analytique
- centrifugeuse
- plaque chauffante
- four à vide
- dessiccateur (compartiment à double paroi dans laquelle circule une huile soluble)

Particularités de la méthode:

À cause de la teneur très variable en matière grasse dans les produits laitiers, la quantité d'échantillon pesée, le nombre d'extractions et le volume de solvant utilisé doivent être ajustés en fonction de chaque type de produits laitiers.

Précision de la méthode:

- ± 0,02% pour les laits écrémés
- ± 0,03% pour les autres laits
- ± 0,1% pour les crèmes

IV. Méthodes de dosage des lipides

Dosage des lipides totales :

Dosage des lipides:

Rôle des réactifs:

- Hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à densité relative 0,8974: 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 en toute proportion; brise toute liaison entre les protéines et les phospholipides qui sont alors inclus avec la matière grasse; facilite la séparation de la phase aqueuse et de la phase organique.
- Éther éthylique (P.E. 35 °C): Dissout la matière grasse et la garde en solution éthérée. L'éther dissout également un peu d'eau contenant une petite quantité de solides non gras qui peuvent causer des résultats erronés à moins de correction subséquente.
- Éther de pétrole 40-60 °C L'éther de pétrole est un mélange d'hydrocarbures ayant des points d'ébullition entre 40 et 60 °C et sert à éliminer de la solution d'éther toute trace d'eau pouvant contenir des solides non gras.