

6. DOSAGES DES COMPOSANTS DES DENREES ET VALEUR ENERGETIQUE

6.1 Détermination de la teneur en eau des denrées

La teneur en eau est la **proportion effective (totale, dosable)** d'eau dans la denrée.

La teneur en eau peut être déterminée comme suit:

- par **perte de poids à la dessiccation** - 103-105°C à l'étuve pendant x heures.

Par cette méthode indirecte, on dose toutes les matières volatiles jusqu'à 105°C et on introduit une erreur plus ou moins importante selon la denrée (négligeable pour certaines denrées – épices, denrées riches en sucre). En réalité, on ne détermine pas la teneur en eau mais la teneur en matière sèche.

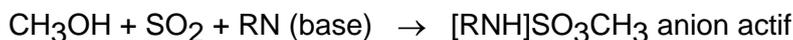
- par **entraînement et distillation avec un solvant** organique non miscible à l'eau, plus léger: toluène ou xylène ou cyclohexane ou plus lourd: CCl₄, perchlor...

L'eau est entraînée par distillation avec les vapeurs du solvant et recueillie dans un tube gradué (voir figure de la page suivante).

Bonne méthode pour les épices, pour lesquelles les teneurs importantes en huiles essentielles faussent trop les résultats de la méthode par dessiccation.

- par réaction chimique - **méthode selon Karl Fischer**

Le réactif de Karl Fischer est un mélange de méthanol, anhydride sulfureux, iode et une base organique (pyridine à l'origine)



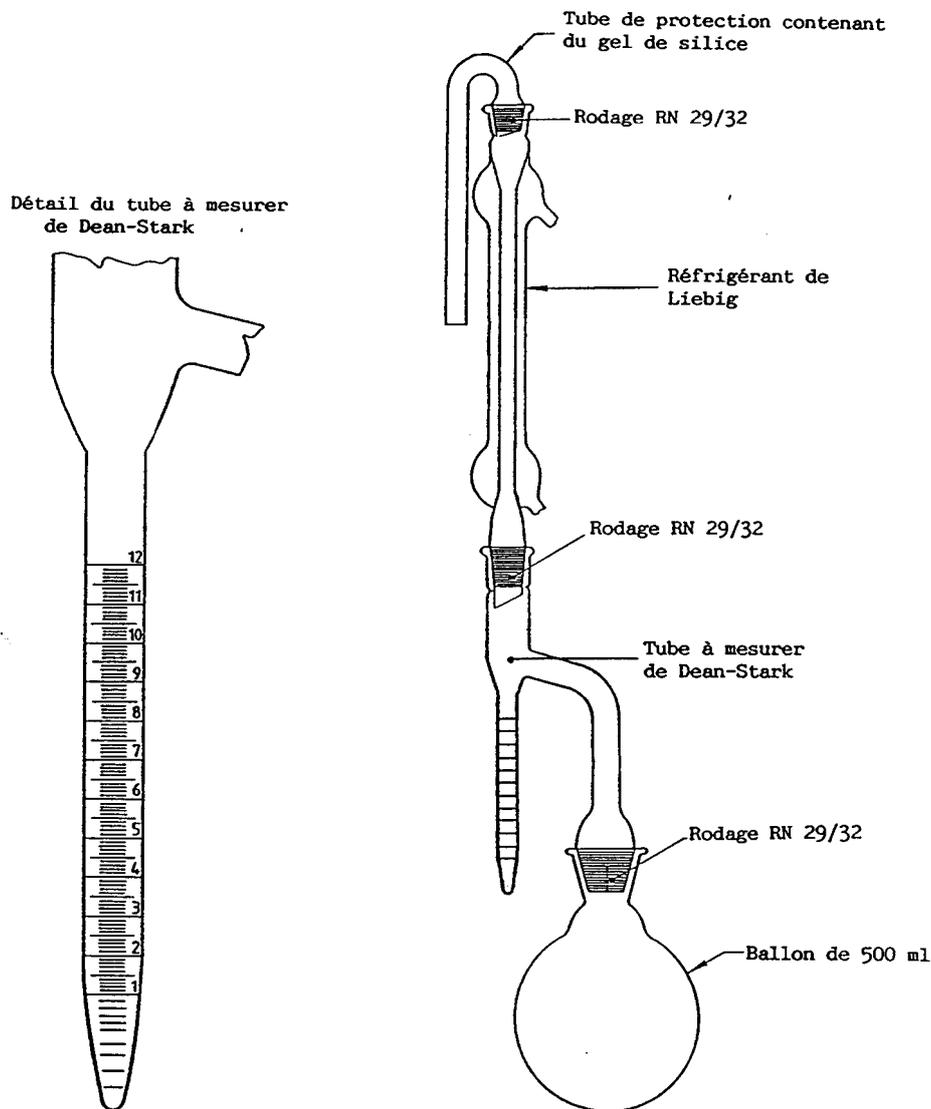
- SO₂ réagit avec l'alcool (méthanol) pour donner un ester qui est neutralisé par la base RN

- l'anion SO₃CH₃ est oxydé en SO₄CH₃ par l'iode, cette réaction consomme de l'eau

- la fin du titrage est déterminée visuellement (coloration brune persistante - critique) ou plus facilement par potentiométrie (en réalité biampérométrie). On établit une ddp constante entre 2 électrodes de Pt, si I₂ absent (car réaction), pas de réaction cathodique (I₂ → 2I⁻) donc pas de courant, à la fin de réaction, présence d'un excès de I₂, par conséquent réaction cathodique et passage courant (30 µA).

Méthode précise (trop ?), mais délicate à mettre en oeuvre (app. automatique).

Appareil pour le dosage de l'eau par distillation azéotropique
(MSDA chapitre 38)



- par détermination de la **densité** ou de **l'indice de réfraction** des liquides (solutions sucrées, jus de fruits) dont on déduit (avec des tables) la teneur en matière sèche et, par différence, la teneur en eau. Exemple: les miels

La méthode est inexacte si les liquides contiennent d'autres composés que le sucre, elle ne peut être appliquée qu'à des matrices bien précises comme les miels, moûts de raisins.

- par mesures de la **conductivité** (produits de la mouture) ou de la **constante diélectrique**: reproductibles mais ne correspondent pas toujours à la teneur réelle en eau.

6.2. Dosage des lipides dans les denrées

6.2.1 Dosage des lipides totaux (ou matière grasse totale)

Dosage basée sur la définition des lipides : insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques.

La quantité de lipides totaux trouvée dans une denrée diffère selon le procédé utilisé (à spécifier). Ce dosage est le plus généralement effectué, soit:

- par **extraction directe** à l'éther (ou éther de pétrole) par malaxage (produits solides), en ampoule à décanter (liquides) ou en continu (soxhlet); après évaporation du solvant d'extraction, le résidu est séché et pesé.

D'autres solvants d'extraction peuvent être utilisés directement ou après séchage de l'échantillon à l'étuve ou sur sulfate de sodium (par exemple hexane ou mélanges alcool-benzène, dioxane-éther de pétrole..).

Cette extraction directe n'est pas totale lorsque des lipides sont retenus mécaniquement (parois cellulaires) ou par adsorption ou liés chimiquement à d'autres composés (protéines); dans ces cas, une désagrégation est nécessaire avant l'extraction.

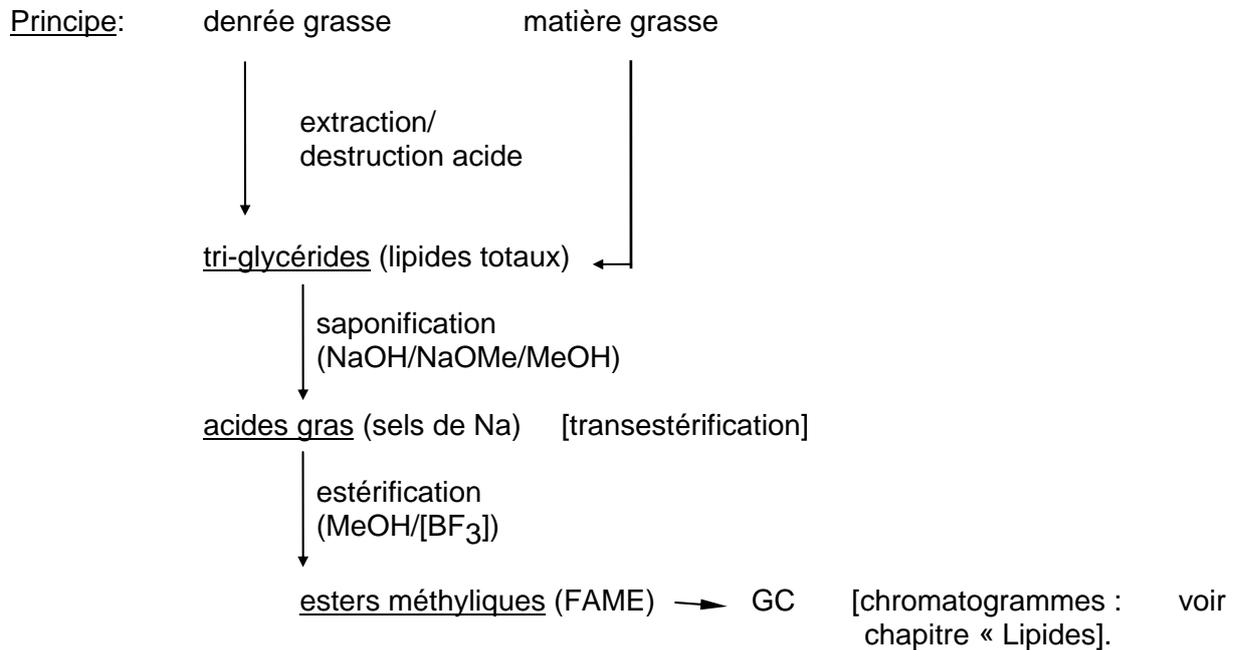
- par **extraction après désagrégation**:

- au moyen d'acide chlorhydrique 25% (méthode internationale). Désagrégation par l'acide à chaud de tous les composés autres que les lipides, qui ensuite sont séparés du mélange par filtration puis extraits au soxhlet au moyen d'éther de pétrole.
- au moyen d'ammoniaque et d'éthanol = méthode de Röse-Gottlieb pour les laits. Après désagrégation (ou plutôt dissolution des protéines et destruction de l'enveloppe des globules gras), la matière grasse est extraite à l'éther et à l'éther de pétrole.
- enzymatique (amylases, protéase) puis extraction des lipides au moyen du mélange méthanol-chloroforme (probablement la méthode la plus universelle).

- par **centrifugation après désagrégation** à chaud par l'acide sulfurique 65% = méthode acido-butyrométrique de Gerber pour les laits. Après dégradation des protéines, ajout d'alcool isoamylique (meilleure séparation des couches) et centrifugation, le volume de graisse est mesuré dans un butyromètre gradué.

6.2.2. Distribution des acides gras et des stérols (notamment le cholestérol)

- *Distribution des acides gras : (rappel)*



- *Distribution des phytostérols et dosage du cholestérol : (rappel)*

- (extraction de la matière grasse [destruction HCl ...])
- saponification
- extraction de l'insaponifiable avec un solvant organique
- purification de la fraction des stérols par chromatographie sur couche mince préparative
- (préparation de dérivés silylés)
- chromatographie en phase gazeuse (capillaire) – [chromatogrammes, voir chapitre « Lipides »]

Ces analyses ont pour but :

- d'une part de caractériser et d'authentifier les huiles et graisses et les denrées riches en certaines matières grasses (voir chapitre « Lipides ») ;

- et d'autre part, de préciser dans l'indication de la valeur nutritionnelle des lipides, les teneurs des différentes sortes d'acides gras et, éventuellement, la quantité de cholestérol présente, en général sous la forme :

- acides gras saturés
- acides gras mono-insaturés
- acides gras polyinsaturés
 - acides gras oméga-6
 - acides gras oméga-3
- cholestérol.

6.3 Dosage des protides dans les denrées

Généralement dans le domaine de l'analyse des denrées alimentaires, le dosage des protides se limite à la mesure de la teneur en protéines brutes, mais dans certains cas l'analyse d'une protéine particulière comme un enzyme ou le dosage des acides aminés libres totaux ou le dosage de certains acides aminés peuvent être utiles.

6.3.1 Dosage des protéines brutes (protéines totales)

L'analyse des protéines brutes dans les denrées alimentaires consiste à doser l'azote total selon Kjeldahl et multiplier la teneur en azote par un facteur conventionnel ($N_{tot} \times 6.25$)

- dosage de l'azote contenu dans la denrée selon Kjeldahl.

La matière organique est détruite par oxydation, sous l'effet combiné de l'acide sulfurique, de catalyseurs et éventuellement de substances destinées à élever le point d'ébullition du mélange. Dans ces conditions l'azote des groupes amino, amido et imino est transformé en sel d'ammonium. L'ammoniac libéré de ce sel en milieu basique est entraîné par distillation et recueilli dans une solution acide de titre connu.

- calcul de la teneur en protéines brutes par multiplication de la teneur en azote trouvée par un facteur de conversion (qui correspond à l'inverse de la teneur en azote dans la protéine). Comme la teneur en azote est variable (fonction des acides aminés présents et de leur proportions), un facteur de conversion différent devrait être utilisé pour chaque sorte de protéine.

Toutefois, lorsque la nature exacte de la protéine n'est pas connue ou si l'on a affaire à une denrée alimentaire contenant plusieurs sortes de protéines, on adopte le facteur conventionnel de 6,25 (correspondant à un taux moyen d'azote de 16 %).

Exemples de facteurs de conversion:

albumine du lait (lait et produits laitiers)		6,38
gélatine		5,55
céréales (blé)		5,70
graines oléagineuses		5,30
protéines de	- viandes	}
	- oeufs	}
	- légumineuses	}
	- denrées complexes	}
		6,25

Dans tous les cas, il faut indiquer dans le rapport d'analyse le facteur utilisé pour le calcul.

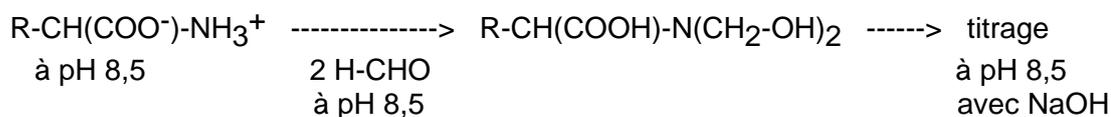
Le dosage des protéines pures peut être fait par précipitation de ces protéines par l'hydroxyde de cuivre (II) et traitement du précipité comme décrit ci-dessus.

La différence entre l'azote total et l'azote des protéines pures correspond à l'azote résiduel (azote des acides aminés libres, peptides à faible PM, bases puriques, alcaloïdes, sels ammoniacaux, nitrates...).

6.3.2 Dosage des acides aminés

- *Dosage des acides aminés libres totaux (indice de formol – méthode de Sørensen)*

Intérêt: le dosage de petites quantités d'acides aminés libres dans les jus de fruits/boissons aux jus de fruits permet d'apprécier la proportion de jus: indice de formol.



La réaction de la formaldéhyde avec la fonction amino libre, par molécule d'acide aminé, un ion H⁺, titrable par une base.

La quantité de soude utilisée dans le titrage, exprimé en ml de solution à 0,1 mol/l pour 100 ml de jus de fruits, représente l'indice de formol de l'échantillon analysé.

- *Séparation et dosage des acides différents aminés des protéines (détermination de l'aminogramme)*

Les acides aminés sont libérés des protéines par une hydrolyse acide (HCl 6 mol/l - 24 h); puis ils peuvent être dosés par différents méthodes chromatographiques (CCM, HPLC, « autoanalyseur » avec colonne d'échange d'ion).

La composition des acides aminés "aminogramme" d'une ou d'un ensemble de protéines sert principalement à l'appréciation de la qualité de ces protéines (le % de chaque acide aminé essentiel présent dans la protéine testée est comparé à celui d'une protéine de référence [celle de l'oeuf par exemple]; l'acide aminé dont le % est le plus bas -facteur limitant n° 1- donne l'indice chimique selon Mitchell de cette protéine).

Exemple:

	mg/g d'a.a. ds la prot. testée	mg/g d'a.a. ds la prot. réf. (oeuf)	%
LYS	83,9	66,4	sup 100
MET	34,0	55,2	61,6
TRP	16,0	16,5	97,0

indice chimique = 61,6

Les techniques de séparation et de quantification des acides aminés sont aussi applicables, si nécessaire, aux acides aminés libres présents dans les denrées (jus de fruits [pour le contrôle de leur authenticité], hydrolysats de protéines).

6.4. Dosage des sels minéraux

Les sels minéraux sont essentiels à l'organisme, notamment parce qu'ils :

- contrôlent l'équilibre hydrique (pression osmotique)
- règlent l'équilibre acide-base (pH)
- font partie de certaines structures (os, dents)
- entrent dans la composition des enzymes, des hormones
- catalysent de nombreuses réactions du métabolisme

Selon les **quantités** mises en jeu dans l'organisme, les sels minéraux sont couramment (et arbitrairement) divisés en 2 groupes:

- les éléments principaux ou **macroéléments**: Ca, P, K, Cl, Na, Mg
- les éléments traces ou **oligoéléments**: Fe, Zn, Cu, Mn, I, Mo, F, Si, Se, etc.

6.4.1 Dosage des matières minérales totales (ou cendres) par incinération

La teneur en cendres d'une denrée s'obtient par incinération (ou combustion complète) dans un four à 550 - 800°C. L'adjonction de réactifs comme le nitrate de lanthane peut faciliter ou accélérer la combustion (cendres moins fusibles).

Toutefois, la teneur en cendres ne correspond pas exactement à la teneur en matières minérales de la denrée (pertes de substances par volatilisation ou augmentation sensible de poids par formation de carbonates ou d'oxydes).

Exemples :

Blé :	matières minérales	2.16 %	
	cendres	1.90 %	pertes de S, Cl, ...
Lait :	matières minérales	0.69 %	
	cendres	0.80 %	augmentation due à la formation de carbonates
jus de pommes:	matières minérales	0,17 %	
	cendres	0,25 %	idem lait

Les cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique sont principalement constituées de silice et silicates. Ce résidu aussi appelé "sable" est assimilé à de la terre et autres impuretés d'origine minérale. Sa teneur est un indice de pureté de certaines denrées (épices, café, cacao...)

La détermination de l'alcalinité des cendres (excès de la fraction basique sur la fraction acide mesuré par titrage) permet parfois de déceler un traitement des denrées examinées: traitement du vin en cave, désacidification ou déminéralisation par échangeurs d'ions...

4.2 Dosage séparé des éléments minéraux

Le dosage d'éléments tels que Na, Mg, Fe, I... sert plutôt à l'appréciation de certains aliments diététiques (denrées pauvres ou sans sodium, denrées avec supplémentation en oligoéléments, produits pour nourrissons..) ou la recherche de falsification (par exemple : dosage de K et P dans les jus de fruits [dilution]).

Ces dosages sont effectués par les méthodes classiques de la chimie analytique (gravimétrie pour P, S, Cl, Si ..., titrimétrie pour S, Cl, Ca, Mg ..., colorimétrie pour P, Cl, Si, Fe) ou par absorption atomique (Na, K, Fe ...), en général après minéralisation.

Exemples:

- dosage de Na et K par photométrie de flamme
- dosage de Ca et Mg ou du fer, par spectrophotométrie d'absorption atomique
- dosage du chlorure par titrimétrie selon Mohr ou Vollard ou par potentiométrie
- dosage du phosphore par colorimétrie :
la teneur en phosphate est mesurée sur la base de la teneur en bleu de molybdène (à 720 nm), obtenu par réaction avec du molybdate d'ammonium et réduction subséquente (par l'acide ascorbique par exemple).

6.5. Dosage des glucides

Il n'existe pas de méthode d'analyse globale des sucres comme il en existe pour les lipides, les protides (protéines), les matières minérales (cendres), etc.

Dans le domaine des glucides, les dosages globaux que l'on peut effectuer concernent:

- les sucres réducteurs (y compris le dosage du saccharose)
- les fibres alimentaires, composées principalement de polysaccharides non assimilables.

La mesure de la quantité totale de glucides (ou hydrates de carbone assimilables) d'une denrée est généralement faite par calcul (différence avec les autres nutriments).

6.5.1 Dosage chimique des sucres fondés sur leur pouvoir réducteur

En milieu alcalin, tous les monosaccharides ainsi que les disaccharides réducteurs (lactose, maltose..) réduisent les combinaisons complexes du cuivre (II) en oxyde de cuivre (I).

Le dosage des sucres directement réducteurs suit le schéma suivant:

- défécation des solutions

Les hydrates de carbone à doser se trouvent généralement mélangés à d'autres substances en solution ou en suspension comme eux et pouvant empêcher ou fausser le dosage des sucres. Ces substances étrangères doivent être éliminées sans que la teneur en hydrates de carbone s'en trouve modifiée; cette clarification est obtenue en provoquant la formation d'un précipité dans le liquide, opération appelée « défécation ».

Les agents de défécation ou clarification doivent donc avoir une action sélective. Certains, tel l'acétate de plomb, agissent par précipitation (sel de plomb) et partiellement par adsorption. Les réactifs de Carrez (hexacyanoferrate II de K et sulfate de Zn) agissent uniquement par adsorption. Ils provoquent la formation d'un précipité à "l'état naissant" entraînant les substances étrangères par "occlusion".

- réduction d'une solution de cuivre (II)

réduction à chaud d'une solution plus ou moins alcaline de sulfate de cuivre

- détermination de la teneur en sucres réducteur:

- en mesurant la quantité d'oxyde de cuivre (I) formée, par complexométrie (Potterat et Eschmann) ou par gravimétrie (Fehling) ou par iodométrie (von Fellenberg)
- ou en mesurant par iodométrie la quantité de cuivre (II) qui n'a pas réagi (Luff et Schoorl)

Le dosage du saccharose (non réducteur) suit le schéma suivant:

- dosage des sucres directement réducteurs (avant inversion), comme décrit ci-dessus
- hydrolyse (inversion) du saccharose en milieu acide chlorhydrique
- dosage des sucres réducteurs après inversion

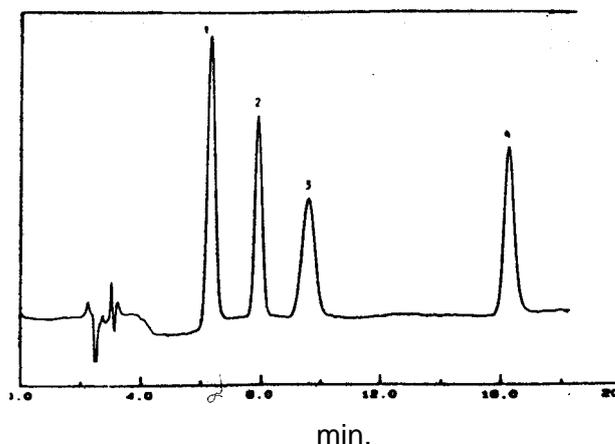
La teneur en saccharose est calculée à partir de la différence entre les résultats du dosage des sucres réducteurs avant et après l'inversion.

6.5.2 Analyse des différents mono- et disaccharides présents dans les denrées

- Méthodes chromatographiques

Après défécation avec les réactifs de Carrez (voir chapitre Glucides), si nécessaire, il est possible de séparer et doser les sucres:

- par **CCM** (méthode sur papier pratiquement abandonnée), détection au nitrate d'Ag ammoniacal, ou détection à la diphénylamine et dosage au moyen d'un densitomètre (ou par HPCCM)
- par **GC** (détecteur FID), après transformation des sucres en leurs oximes (C=NOH) et dérivés silylés (C-O-Si-) - colonne OV 17
- par **HPLC** : exemple



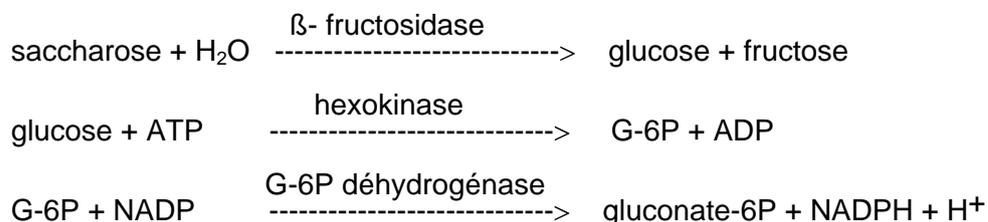
phase: gel de silice modifiée par des groupes amino (ex. Lichrospher-NH₂), éluant: acétonitrile - eau (ex. 80/20 v/v à 1,0 ml/min), détecteur à indice de réfraction (RI)

1. xylose, 2. fructose, 3. glucose, 4. saccharose

- Méthodes enzymatiques

Les dosages enzymatiques peuvent être effectués pour les sucres suivants: glucose, fructose, saccharose, lactose, galactose (amidon après hydrolyse)

Exemple: dosage enzymatique du saccharose (méthode Boehringer)



la teneur en NADPH formé (directement proportionnel à la teneur en saccharose) est mesurée par adsorption dans l'UV à 340 nm.

6.5.3 Dosage des fibres alimentaires (méthode enzymatico-gravimétrique)

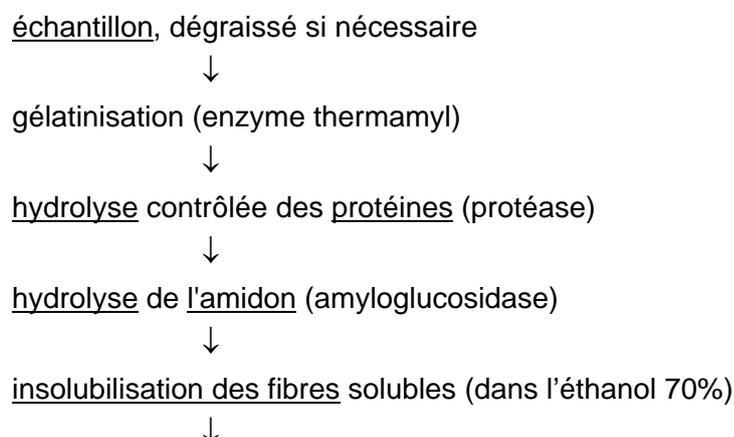
Anciennement, le dosage des fibres se limitait au dosage de la cellulose par des méthodes rudimentaires dont le résultat ne répond pas à la définition des fibres.

Il existe plusieurs méthodes de dosage des fibres alimentaires, toutes basées sur l'un ou l'autre des deux principes suivants:

- les méthodes gravimétriques qui procèdent par élimination de substances "non fibres" (protéines, amidon, lipides..) par voie chimique ou enzymatique suivie de la pesée du résidu
- les méthodes chimiques ou directes dosant individuellement les différents constituants des fibres.

La méthode actuellement reconnue comme la plus valable (proche de notre processus de digestion) est une méthode gravimétrique dans laquelle l'élimination des protéines et des amidons de l'échantillon est faite par voie enzymatique.

Le schéma de cette méthode est le suivant:



filtration des fibres totales (insolubles et solubles)



lavage, séchage, pesée du résidu



détermination dans le résidu des: - protéines restantes (Kjeldahl)
- cendres (incinération)

Résidu - protéines restantes - cendres = **fibres alimentaires**

6.5.4 Dosage des sucres totaux par différence

Lorsqu'il n'est pas nécessaire de connaître les différents sucres présents dans une denrée, on peut se contenter de calculer la teneur globale en glucides (ou hydrates de carbone assimilables) par différence avec les autres constituants:

**glucides = total - [eau + lipides + protides + matières minérales (cendres)
+ fibres alimentaires, évtl]**

6.6. Dosage des vitamines

Les méthodes d'analyse mises en jeu sont soit des méthodes chimiques et physico-chimiques soit des méthodes microbiologiques soit des méthodes biologiques:

6.6.1 Méthodes chimiques et physico-chimiques:

- par colorimétrie ou photométrie: vit.A (méthode Carr-Price), β -carotène...
- par fluorimétrie: B1 après oxydation en thiochrome, B2...
- par HPLC

presque toutes les vitamines peuvent être analysées par HPLC; un exemple classique est la séparation des tocophérols (vit. E) d'une huile de germe de blé (voir chromatogramme page suivante).

6.6.2 Méthodes microbiologiques

un microorganisme dont le métabolisme et la croissance dépendent de la présence et de la concentration de la vitamine recherchée est mis en présence d'un extrait de la denrée à examiner. L'intensité du rendement métabolique ou de la croissance est mesurée (titrimétrie, gravimétrie ou turbidimétrie) et comparée avec celle obtenue une série de standards de concentrations différentes.

méthodes très sensibles et très spécifiques, principalement utilisées pour les vitamines du groupe B, mais fastidieuses.

Exemples:

vit. B2 avec Lactobacillus casei - mesure par titrage du lactate formé, vit. B6 avec Neurospora sitophila - mesure par gravimétrie du mycélium formé ou Saccharomyces

carlsbergensis - mesure par turbidimétrie, de même pour la vit. B12 avec Poteriochromonas stipitata ou Lactobacillus leichmanii...

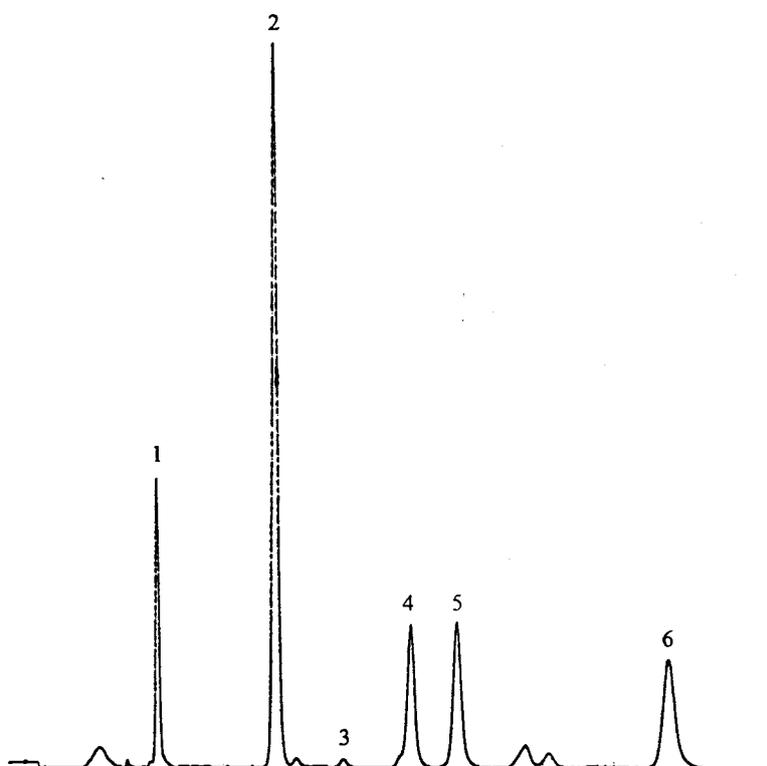
6.6.3 Méthodes biologiques

Ces méthodes de tests sur animaux ne sont plus actuellement utilisées que pour les vitamines difficilement extractibles comme celles du groupe D.

Dans ce cas, on donne à des rats rachitiques des doses différentes de la préparation à tester et on observe l'effet sur la santé des rats (mesure par rayons X des épiphyses du tibia); test qui nécessite beaucoup de temps (plusieurs semaines) et d'animaux, et, qui, de plus, est peu précis.

Maintenant la HPLC a largement remplacé ce type de test.

Exemple: Dosage des tocophérols dans les huiles et graisses par HPLC



Chromatogramme en HPLC d'une huile de germe de blé (MSDA chapitre 62)

1 α -tocophérol acétate; 2 α -tocophérol; 3 α -tocotriénol; 4 β -tocophérol
5 γ -tocophérol; 6 δ -tocophérol.

Les pics des β - et γ -tocophérols ont été augmentés par un ajout de ces isomères. En outre, l' α -tocophérol acétate qui ne se trouve pas dans l'huile de germe de blé, a été ajouté.

Conditions: colonne LiChrosorb Si 60, 7 μ m
éluant: n-hexane/dioxane (97 + 3)
détecteur de fluorescence

6.7 Dosages particuliers

- Dosage de l'alcool : par distillation et densitométrie (au moyen d'un fréquence-mètre).
- Dosage de l'acide acétique : par distillation et titration acide-base.
- Dosage des sucres-alcool (polyols) : par HPLC.

6.8. Calcul de la valeur énergétique des denrées alimentaires

Deux principes sont à la base de l'évaluation de la valeur nutritive calorique (ou énergétique) d'une denrée:

- Toute partie digestible d'un aliment fournit, après son assimilation dans l'organisme, un nombre de calories en rapport avec la quantité ingérée.
- Les constituants principaux des aliments (protéines, graisses, hydrates de carbone) peuvent généralement se substituer les uns aux autres (loi de l'isodynamie)

il s'ensuit que le nombre total de calories d'une denrée s'obtient directement par addition des valeurs caloriques des différents nutriments.

Le pouvoir énergétique calorifique des différents nutriments a été mesuré expérimentalement dans les meilleures conditions. A partir de ces valeurs expérimentales, des valeurs moyennes ont été fixées pour chaque nutriment.

Valeurs caloriques moyennes

protéines	4 kcal/g (17 kJ)
lipides	9 kcal/g (37 kJ)
glucides (assimilables)	4 kcal/g (17 kJ)
polyols (sucres alcools)	2,4 kcal/g (10 kJ)
alcool (éthanol)	7 kcal/g (29 kJ)
acides organiques	3 kcal/l (13 kJ)
polydextroses, inuline	1 kcal/g (4 kJ/g)

Calcul de la valeur énergétique d'une denrée

- *Déterminer les teneurs en:*

- eau [ou indirectement matière sèche (dessiccation)]
- protéines brutes (protides)
- matière grasse totale (lipides)
- cendres
- éventuellement, fibres alimentaires
- éventuellement, acides organiques, alcool et polyols

- *Calculer la teneur en glucides par différence:*

glucides = 100 - (eau, lipides, protéines, cendres, évtl. fibres polyols, acides et alcool)

- *Calcul de la valeur énergétique*

multiplier les teneurs de chaque composants (en g) par les valeurs caloriques moyennes (en kcal ou kJ) et faire la somme.

La valeur nutritive calorique (ou énergétique) est donnée en kcal/100 g ou 100 ml de denrées ou en kJ/100 g ou 100 ml.
