



TP N° 5 De Biochimie Structurale

DETERMINATION DES INDICES CHIMIQUES Des LIPIDES TOTAUX (Huiles et graisses alimentaires)

Introduction : On appelle lipides des substances naturelles (huiles, beurres, graisses) insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Ces corps gras naturels sont en majeure partie constitués d'un mélange de triglycérides mixtes. Ces triglycérides sont des esters de glycérol et d'acides gras. Les huiles peuvent être caractérisées par certain nombre de propriétés chimiques : fixation d'iode sur les doubles liaisons d'acides gras insaturés, saponification et détermination de l'acidité libre et du degré d'estérification par une base forte. Ainsi, on détermine des indices qui sont des données conventionnelles exprimés par des nombres sans unités qui donnent des informations utiles sur la composition et le degré de pureté d'un corps gras.

1) L'indice d'acide : (IA)

Les matières grasses fraîches contiennent peu d'acides gras libres. Elles s'altèrent par vieillissement en donnant naissance par hydrolyse à des acides gras libres et à du glycérol. La mesure de l'acidité d'un corps gras est une méthode très utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour déterminer son altération par hydrolyse. Elle revêt une grande importance pour l'estimation de la valeur commerciale d'un corps gras.

- Définition : L'indice d'acide est la quantité en mg de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenu dans un gramme de substance.
- Principe : Neutralisation des acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde titrée.
- Réactifs : Ethanol à 95%, Hydroxyde de potassium (solution éthanolique titrée à 0,1 mol/l), phénolphthaléine à 0,2% (dans l'éthanol).
- Manipulation : Peser précisément 1 g du lipide (huile et/ou graisse) à analyser dans un erlenmeyer de 100 ml. Dissoudre la prise d'essai dans 5 ml d'éthanol. Ajouter 2 gouttes de phénolphthaléine. Titrer l'acidité libre par la potasse alcoolique 0,1 M jusqu'à ce que la coloration rose persiste au moins 30 secondes. On note le volume de la solution éthanolique de KOH ajoutée.
- Expression des résultats : L'indice d'acide est donné par la formule :

$$\text{IA} = 5,61 \times V/m$$

5,61 g/l : correspond à 0,1 mole/l de KOH

V : Volume en ml de la solution éthanolique de KOH (0,1 mole/l) utilisée pour le titrage.

m : masse en gramme de l'huile

- Questions : Comparer les résultats obtenus pour chaque huile et avec la bibliographie.

Remarques : Les acides gras forment avec la potasse du savon. La coloration rose de la phénolphthaléine ne peut être stable ; en effet, au bout de quelques secondes, une hydrolyse partielle de la matière grasse aboutit à la libération d'acides gras.

Ordre de grandeur de l'indice d'acide pour un triglycéride : 0 à 10

Ordre de grandeur de l'indice d'acide pour un acide gras : 100 à 300

Ces valeurs ne sont que des ordres de grandeur et dépendent fortement de la masse molaire des produits et de leur degré de pureté.

2) Indice de saponification : (IS)

Si l'on traite un TG par la potasse, on obtient du glycérol et AG sous forme de sel ou savon. L'indice de saponification dépend de la teneur du corps gras en produits insaponifiables (stérols, Vit E, etc...), en acides gras libres et de la proportion de mono, di ou triglycérides.

- a) Définition : L'indice de saponification est la quantité en mg de potasse nécessaire pour la neutralisation et la saponification des liaisons esters des acides gras (TG) et les AG libres contenus dans 1 g de matière grasse.
- b) Principe : On saponifie à chaud, en présence d'un excès connu de KOH alcoolique une prise d'essai de corps gras. L'excès de réactif est titré par une solution acide en présence de phénolphthaléine (dosage en retour).
- c) Réactifs : Hydroxyde de potassium (solution éthanolique titrée à 0,5 mole/l), Acide chlorhydrique (solution titrée à 0,5 mole/l), phénolphthaléine à 0,2%.
- d) Appareillage : Dispositif comprenant un ballon en verre à col rodé auquel est adapté un réfrigérant, Eprouvette, Burette, Balance analytique et chauffe ballon.
- e) Manipulation : Peser précisément environ 2 g du lipide à analyser dans un ballon à col rodé de 100 ml. Ajouter à l'aide d'une burette 25 ml de KOH alcoolique 0,5 M. Agiter doucement. Ajouter deux ou trois morceaux de pierre de ponce (pour adoucir l'ébullition) puis adapter un réfrigérant à reflux et porter à l'ébullition au chauffe-ballon pendant 30 mn. Retirer le ballon du chauffe-ballon, laisser refroidir quelques minutes et doser l'excès de potasse avec HCl en présence de phénolphthaléine. Parallèlement à l'opération citée, faire un essai à blanc sans chauffer et sans lipide pour titrer la solution de potasse.
- f) Expression des résultats :

L'indice de saponification est donné par la formule :

$$I.S = \frac{(V_0 - V)}{m} \times 28$$

V_0 : Volume en ml de la solution HCl (0,5 mole/l) utilisée pour l'essai à blanc.

V : Volume en ml de la solution HCl (0,5 mole/l) utilisée

m : masse en gramme de l'huile.

g) Questions :

- Comparer les résultats obtenus pour chaque huile et avec la bibliographie.
- En déduire le poids moléculaire du corps gras et le nom de l'acide gras correspondant (dominant) en supposant qu'il s'agit d'un TG homogène

3) Indice d'ester : (IE)

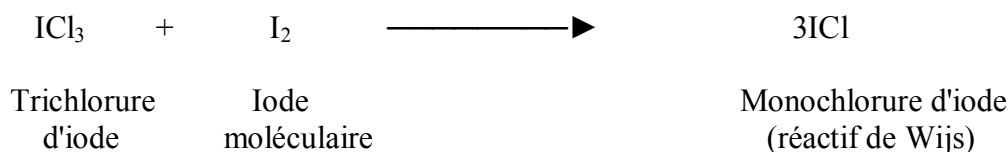
$$IE = IS - IA$$

4) Indice d'iode : (I.I)

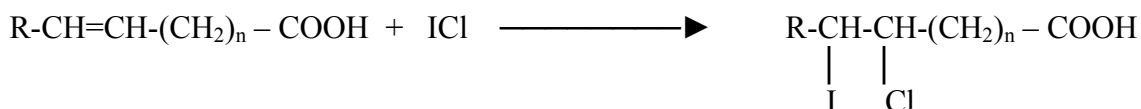
Les liaisons éthyléniques et acétyléniques des acides gras sont susceptibles de fixer l'iode ou ses dérivés halogénés (chlorure ou bromure d'iode) ce qui permet de mesurer l'**insaturation** des corps gras.

- Définition : L'indice d'iode ou indice de HUBEL d'un corps gras est le nombre de grammes d'iode fixés par 100g de ce corps gras.
- Principe : L'iode à l'état moléculaire (I₂) se fixe lentement sur les corps gras insaturés. C'est pourquoi on utilise le réactif de Wijs qui contient de l'iode sous forme plus réactive. Cet indice augmente en fonction de la proportion des acides gras insaturés.

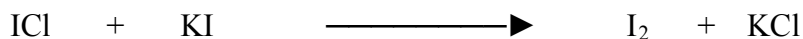
On l'obtient à partir de la réaction suivante :



On opère en présence d'un excès de réactif de Wijs qui possède un ion I⁺ électrophile un ion Cl⁻ nucléophile. L'addition de ce réactif sur les doubles liaisons se fait selon la réaction :



Les ions I⁺ en excès sont réduits à l'état moléculaire I₂ par addition d'iodure de potassium KI selon la réaction :



L'iode moléculaire ainsi libéré est dosé par une solution de thiosulfate de sodium selon la réaction :



En déterminant la quantité d'iode libérée d'une part, dans un essai réel (corps gras + réactif), d'autre par dans un essai à blanc (réactif seul) on peut déduire celle qui a été fixée par le corps gras.

Le mélange réactionnel est porté à l'obscurité et titré aussi vite que possible, car les dérivés halogénés s'oxydent à la lumière.

Remarques :

- L'addition de KI double la quantité d'iode mise en jeu. La détermination d'iode fixé par différence entre l'essai réel et l'essai à blanc donne un résultat qui est effectivement double de l'iode fixé.
- L'indice d'iode permet de classer les huiles en huiles :
 - non siccatives (olive, arachide, amande) dont l'I.I est < 100
 - semi-siccative (coton, sésame, maïs) dont l'I.I est compris entre 100 et 130
 - siccatives (noix, lin) dont l'I.I est > 130

- c) Manipulation : Peser, au mg près, 0,5g de matière grasse à analyser dans un erlenmeyer de 100 ml rodé. Solubiliser dans 5 ml de CCl₄ (tétrachlorure de carbone) ou de CHCl₃ (chloroforme). Simultanément, préparer un flacon témoin sans le lipide. Sous la hotte, ajouter 10 ml de réactif de Wijs dans chaque erlenmeyer. Boucher les erlenmeyers. Agiter légèrement et placer à l'abri de la lumière pendant 1 h 30 (dans un placard, sous la paillasse). Ajouter ensuite dans les deux erlenmeyers 5 ml de la solution d'iodure de potassium à 2 %.

Ajouter une goutte d'empois d'amidon et titrer l'iode moléculaire I₂ à l'aide du thiosulfate de sodium 0,1 M jusqu'à décoloration. Terminer le titrage en agitant énergiquement: l'iode dissous dans le solvant repasse dans la solution aqueuse et peut ainsi être totalement dosé. Ajouter une goutte d'empois d'amidon pour vérifier que la totalité de l'iode I₂ a bien été dosée. Poursuivre le titrage si l'empois d'amidon se colore.

- d) Expression des résultats :

$$I.I = N (V_{\text{témoin}} - V_{\text{essai}}) \times 127 / m \cdot 10$$

N : normalité du thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃)

m : masse en g de la prise d'essai (huile)

- e) Questions :

- Comparer les résultats obtenus pour chaque huile et avec la bibliographie.
- A votre avis, à partir de vos résultats peut-on connaître avec exactitude l'acide gras du lipide étudié ? Justifier votre réponse
- calculer le nombre de doubles liaisons par molécules d'acides gras

$$n = I.I \times M / 254 \times 100$$

n : nombre de doubles liaisons

M : masse molaire de l'acide gras correspondant (supposant TG homogène)