caséinate et de phosphate de calcium, se rapprochant dans son état micellaire, sa concentration et son pH du lait (par litre : 30 gr. de caséine, 1,100 gr. d'oxyde de calcium, 0,7498 gr. d'acide phosphorique ; $pH = 7$).

A cet effet, on empâte 0,15 gr. de substance sèche avec un peu d'eau, en la broyant dans un mortier. A la pâte homogène, on ajoute goutte à goutte, en broyant toujours, 4,9 cm³ d'eau de chaux à 1,12 gr. CaO/l. Le caséinate de calcium, d'abord blanchâtre, prend un aspect de colle opalescente. Dans ce caséinate, on introduit par très petites gouttes (microburette) espacées, en agitant énergiquement, l'acide phosphorique sous forme de 0,58 cm³ d'une solution 1/15-mol. De cette manière, il ne se produit aucun précipité visible, et on obtient un liquide laiteux d'apparence parfaitement homogène.

Pour l'essai à la présure, la solution est portée dans un bain-marie à 40° et additionnée de 1 goutte d'extrait de présure commerciale.

La caséine entière fait prise immédiatement, le caillé est assez ferme pour qu'on puisse retourner l'éprouvette sans qu'il se détache. La caséine α se comporte comme la caséine entière. Avec la caséine β par contre, il ne se forme que lentement un coagulum très mou ; il n'est pas question de pouvoir retourner l'éprouvette.

DOSAGE DES MATIÈRES GRASSES DU LAIT

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'EXTRACTION PAR L'ÉTHÉR ALCOOLISÉ DANS L'APPAREIL DE SOXHLET (MÉTHODE OFFICIELLE) ET DE L'EXTRACTION PAR L'ALCOOL DANS L'APPAREIL DE KUMAGAWA ET DANS L'APPAREIL DE SOXHLET (1)

par

J. E. LOBSTEIN

et

M. FLATTER

Professeur

Assistant

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Si l'on considère les différentes méthodes qui ont été préconisées pour le dosage des matières grasses dans le lait, on est frappé par leur multitude et leur diversité, et il semble logique de penser que le grand nombre des techniques proposées prouve implicitement qu'aucune d'elles n'est parfaite. Sans prétendre les énumérer toutes, — énumération qui risquerait fort d'ailleurs de demeurer incomplète malgré tout, car chaque laboratoire a pour ainsi dire son procédé propre ou une modification particulière d'une méthode connue, — nous en rappellerons du moins les principes généraux, ce rappel nous paraissant utile pour expliquer l'objet de notre étude.

Suivant une répartition classique, on peut distinguer deux groupes de méthodes pour le dosage des matières grasses dans le lait :

- 1° les méthodes volumétriques,
- 2° les méthodes pondérales.

Les méthodes volumétriques consistent à provoquer la sépara-

(1) Paru dans le *Volume jubilaire du Professeur Ch. Porcher*.

tion de la matière grasse fondue ou en solution dans un solvant approprié, et à lire son volume : on en déduit son poids par le calcul.

Pour rendre cette séparation possible, on solubilise la caséine, soit par des acides concentrés : acide sulfurique (BABCOCK [19], GERBER [9], TEICHERT [20]), acide chlorhydrique (LEZÉ [22]), soit par des alcalis : ammoniacque (MARCHAND, ADAM [22]), soude (HOYBERG [8]), potasse et ammoniacque (FOUARD [22]), soit par des substances spéciales : résorcine (LINDET [9]), phosphate trisodique (SICHLER [22]), soit par des mélanges complexes : sel de Seignette, chlorure de sodium et soude (SAL [11]).

D'autre part, on facilite la séparation du « beurre » par certains solvants : éther et alcool éthylique (MARCHAND, ADAM), alcool butylique (SICHLER, SAL), alcool méthylique et isobutylique (HOYBERG), alcool amylique (GERBER, TEICHERT).

Quant aux méthodes pondérales, elles reposent sur une extraction de la matière grasse par un ou plusieurs solvants des lipides et la pesée de l'extrait obtenu. Primitivement (GRANDEAU, KÜHN, DUCLAUX, etc. [9]), on opérait sur du lait desséché au bain-marie en présence d'une matière inerte (sable, marbre pulvérisé). Tout récemment, M. PAGET [14] a préconisé une dessiccation du lait à froid au moyen du sulfate de soude anhydre. Mais plus communément, dans les méthodes actuelles, on épuise le précipité produit par l'alcool acétique (méthode officielle), ou l'eau acétique (méthode du Laboratoire municipal de Paris), ou l'acide chlorhydrique (WEIBULL [20]).

Cette classification, comme toute classification, n'est pas absolue : il existe des méthodes mixtes comportant à la fois la solubilisation de la caséine et l'extraction de la graisse par un solvant, puis la pesée de l'extrait ainsi obtenu (ADAM, GOTTLIEB-RÖSE [19]).

Au point de vue de l'exactitude de ces différentes méthodes, il est généralement admis que les procédés volumétriques ne sauraient avoir qu'une valeur relative. Abstraction faite des difficultés d'ordre pratique qu'ils peuvent présenter, ils soulèvent un certain nombre d'objections théoriques :

1. Pour effectuer la conversion du volume lu en poids, l'on se base sur une composition et une densité moyenne du beurre, données qui, comme on le sait, sont loin d'être constantes.

2. La graisse se trouve modifiée par le contact de certains réactifs (acide sulfurique chaud) ; elle est forcément plus ou moins impure (alcool amylique, butylique, etc.).

3. La séparation peut ne pas être totale. En effet, HOYBERG [7] a montré, par exemple, que le procédé de GERBER fournit des résultats variables suivant la vitesse de rotation des centrifuges. D'autre part,

l'analyse de quelques poudres de lait a donné des résultats déficitaires avec les méthodes utilisant les alcalis, car, un début de saponification ayant eu lieu, les savons formés sont restés en solution aqueuse [20].

Au contraire, on attribue en général aux méthodes pondérales une valeur absolue ; néanmoins, elles reposent sur plusieurs postulats qui demandent une vérification expérimentale :

1. Le lait desséché ou le coagulum renferment toutes les matières grasses du lait, et non modifiées.

2. Le solvant employé épuise intégralement les matières grasses.

3. Le solvant employé n'épuise uniquement que les matières grasses.

Pour nous rendre compte si ces principes sont conformes à la réalité, nous nous sommes adressés à la méthode officielle « admise par la Commission technique permanente du Ministère de l'Agriculture pour l'usage des Laboratoires d'Etat (*Journal Officiel* du 9 mars 1907) », méthode à laquelle nous avons comparé celle de KUMAGAWA-SUTO [10]. L'on sait en effet que l'extraction par l'alcool bouillant dans l'appareil des chimistes japonais constitue actuellement la méthode la plus parfaite pour enlever les lipides aux tissus animaux et végétaux. Il nous a paru intéressant de l'appliquer au dosage des matières grasses dans le lait. A vrai dire, un tel essai a été fait, mais accessoirement et sans étude critique, par M. VLADESCO [23]. Cet auteur, appliquant au dosage de la graisse du lait un procédé de solubilisation de la matière organique au moyen de l'acide azotique, compare certains des résultats obtenus par sa méthode à ceux fournis par la méthode de KUMAGAWA-SUTO. Plus récemment, dans de très intéressantes recherches sur « la graisse du sang et la graisse du lait pendant la lactation », MM. PORCHER et MAYNARD [15] ont utilisé parfois simultanément la méthode de MEILLERE et la méthode de KUMAGAWA pour le dosage du beurre : ils constatèrent que les valeurs déterminées par cette dernière sont toujours un peu plus basses, les différences, assez constantes, ne dépassant jamais 10 %. Toutefois, dans leur travail, cette comparaison, qui ne présentait du reste qu'un intérêt secondaire, demeure accessoire également.

Une étude spéciale, plus approfondie, restait donc à faire, de même qu'une comparaison avec la méthode officielle. En outre, — et pour compléter des recherches analogues entreprises dans notre laboratoire sur d'autres substances, — il nous a paru intéressant également de comparer avec les résultats ainsi fournis par la méthode de KUMAGAWA, ceux que donne l'extraction par l'alcool dans l'appareil de SOXHLET, où la température du solvant, dans le digesteur, ne dépasse pas 58°.

Au total, 1° étudier la valeur de la méthode officielle en soi, 2° comparer ses résultats à ceux de la méthode de KUMAGAWA,

3° voir si l'extraction alcoolique dans l'appareil de SOXHLET diffère beaucoup de cette dernière, tel est l'objet du présent travail.

TECHNIQUE DES MÉTHODES EMPLOYÉES.

A. MÉTHODE OFFICIELLE : extraction par l'éther alcoolisé dans l'appareil de Soxhlet.

Il existe en réalité deux méthodes officielles de dosage des matières grasses du lait : 1° un procédé par épuisement dans l'appareil de SOXHLET au moyen de l'éther éthylique alcoolisé ; 2° un procédé d'épuisement à froid par centrifugation au moyen du même solvant. Nous n'avons fait porter nos essais que sur le premier procédé, qui est le plus communément employé.

En voici la technique :

Réactifs	{	(1) Alcool à 95°.
		(2) Alcool à 35°.
		(3) Alcool à 65° acidifié au 1/1.000 par de l'acide acétique.
		(4) Ether éthylique à 65°.

Mode opératoire :

1° Placer dans un petit vase à précipité 25 cm³ d'alcool acidifié. Mesurer exactement 10 cm³ de lait, les verser dans le réactif précédent goutte à goutte, en agitant, au fur et à mesure, le mélange ;

2° Après un quart d'heure de repos, filtrer le coagulum formé sur filtre taré de 11 cm. de diamètre, humecté préalablement avec de l'alcool ; recueillir le liquide filtré dans une fiole jaugée de 100 cm³ ;

3° Lorsque le filtre est égoutté, laver le vase à précipité à trois reprises différentes avec 10 cm³ d'alcool à 35° ; on verse chaque fois les liquides alcooliques sur le filtre, en ayant soin de laisser égoutter celui-ci après chaque lavage ; on termine en arrosant le filtre avec 10 cm³ d'alcool à 35° (tous ces liquides sont recueillis dans la fiole jaugée précédente et l'on complète le volume à 100 cm³ avec de l'eau distillée : la liqueur ainsi obtenue sert au dosage du lactose) ;

4° Essorer entre des doubles de papier buvard le filtre contenant le coagulum (beurre, caséine) et l'introduire dans l'appareil à épuisement de SOXHLET ;

5° Verser sur le filtre 10 cm³ d'alcool à 95° en laissant le précipité s'humecter un instant ;

6° Mettre dans le petit ballon taré de l'appareil 40 cm³ d'éther et faire l'épuisement comme de coutume en chauffant l'éther dans un bain d'eau à une température d'environ 40° ;

7° L'épuisement terminé, détacher le ballon de l'appareil, chasser par distillation l'éther et l'alcool ; le beurre qui reste est desséché à 100° ; peser le ballon : la différence avec son poids primitif donne la quantité de beurre pour 10 cm³ de lait.

La méthode officielle n'indique pas la durée de l'épuisement : par

uniformité avec la méthode de KUMAGAWA, nous l'avons fixée à huit heures.

B. MÉTHODE D'EXTRACTION PAR L'ALCOOL DANS L'APPAREIL DE SOXHLET.

L'épuisement a été fait par l'alcool à 95°, et sa durée a été également de 8 heures.

C. MÉTHODE DE KUMAGAWA-SUTO, MODIFIÉE PAR LEMELAND [12].

Elle comporte la série d'opérations suivantes, rappelées dans leurs traits essentiels :

1° Epuisement du coagulum dans l'appareil de KUMAGAWA pendant 8 heures par l'alcool à 95° ;

2° Evaporation du liquide extractif sous pression réduite et dessiccation à 50° dans le vide. Nous avons maintenu ce séjour dans le vide sulfurique à 50° pendant 15 heures ;

3° Saponification de l'extrait total par 50 cm³ de potasse alcoolique 2N pendant 2 heures au réfrigérant à reflux ; on ajoute alors 45 à 50 cm³ d'eau et l'on chauffe jusqu'à clarification complète (un quart d'heure) ;

4° Extraction de l'insaponifiable : la solution alcaline alcoolique est versée quantitativement dans une ampoule à décantation et épuisée à trois reprises par de l'éther de pétrole (P.E. 50-70°) en utilisant chaque fois 70 cm³ de solvant. Les solutions étherées réunies sont lavées avec 100 cm³ d'eau, qu'il est préférable de rendre très légèrement alcaline (cette eau de lavage est ensuite ajoutée à la solution alcoolique restante), puis évaporées à sec sous pression réduite ; on reprend par 10 cm³ d'éther de pétrole sec (P.E. 50°), laisse reposer quelques heures et filtre sur amiante et sable dans un petit ballon taré. Le filtrat est évaporé dans le vide à la température ordinaire ; le résidu de l'évaporation, qui représente l'*insaponifiable*, est desséché à 50°, également dans le vide, puis pesé.

A cause des substances volatiles qui composent en tout ou en partie l'insaponifiable, LEMELAND recommande, d'une façon générale, de ne faire aucun desséchement à des températures dépassant 50° ; il fixe à 1 heure la durée de la dessiccation, dans le vide, à 50°, de l'insaponifiable et aussi des acides gras : elle est censée assurer un desséchement complet ; mais cela n'est pas, et nous l'avons prolongée au minimum 3 heures. (C'est la durée indiquée également par BELIN [2].) D'ailleurs, une telle dessiccation, poursuivie 3 heures, ne nous a pas donné un poids constant, et nous verrons, dans la discussion des résultats, les difficultés que soulèvent les constituants volatils de la matière grasse du lait.

5° Extraction des acides gras : La solution alcaline alcoolique provenant de l'extraction de l'insaponifiable additionnée de l'eau de lavage est acidifiée par 10 cm³ d'acide chlorhydrique. Les acides gras libérés sont extraits par l'éther de pétrole, comme l'insaponifiable ; le liquide étheré est lavé à l'eau

distillée pour enlever l'acide entraîné, puis traité comme la solution pétrolique d'insaponifiable : on obtient ainsi le *poids des acides gras* :

6° Calcul du poids des glycérides : Pour convertir en graisses neutres les acides gras, KUMAGAWA multiplie le poids de ceux-ci par le coefficient 1,046, qui représente le rapport entre le poids moléculaire moyen de la trioléine, la tripalmitine, la tristéarine (soit 860,8) et celui des acides correspondants (soit $274,3 \times 3 = 822,9$).

Or le poids moléculaire moyen des acides gras du lait (1) est 231,7 (soit $231,7 \times 3 = 695,1$, puisqu'une molécule de glycérine correspond à 3 molécules d'acides gras), celui des glycérides correspondants est 733,1, ce qui

donne le coefficient $\frac{733,1}{695,1} = 1,054$.

	Valeurs extrêmes	Moyenne (d'après Hilditch)
Acides volatils...	Acide butyrique	2,9- 4,5 %
	Acide caproïque	1,3- 2,3 %
	Acide caprylique	1,0- 1,9 %
	Acide caprique	1,0- 1,5 %
	Acide laurique	3,6- 6,4 %
Acides fixes	Acide myristique	10,4-20,1 %
	Acide palmitique	11,8-17,5 %
	Acide stéarique	1,1- 5,9 %
	Acide oléique	27,0-47,0 %
	Acide d. l. décylénique, environ	0,007 %
	Acide linoléique	traces

Les extractions par l'alcool au Soxhlet et au Kumagawa ont porté sur des coagulums préparés, filtrés, lavés et essorés comme l'indique la méthode officielle. A cet effet, dans les essais que nous relatons, nous avons utilisé, non des cartouches, mais des filtres de même nature que celui employé dans la méthode officielle. Les coagulums soumis à l'épuisement se trouvaient donc en tout semblables dans les trois méthodes envisagées.

Dans les extraits totaux obtenus par la méthode officielle et par l'extraction alcoolique au Soxhlet, nous avons dosé les acides gras et l'insaponifiable selon la technique de KUMAGAWA et LEMELAND. Et pour que la comparaison des méthodes fût plus rationnelle, nous avons, dans une série d'expériences, desséché les extraits totaux à 100° après distillation du solvant à la pression ordinaire, comme l'indique la méthode officielle ; — et dans une autre série d'expériences, les extraits furent desséchés à 50° seulement, dans le vide sulfurique, pendant 15 heures, le solvant ayant été distillé sous pression réduite pour ne pas dépasser cette température, comme le prescrit la technique de LEMELAND.

La méthode officielle ne fixe pas la durée de la dessiccation à 100°

(1) Acides gras du lait (in *Analyse der Fette und Wachse*, par GRÜN et HALDEN, Berlin, J. Springer, éd., 1929, 2).

de l'extrait total; peut-être est-il sous-entendu: « jusqu'à poids constant ». Nous l'avons, dans tous les cas, maintenue 3 heures.

Pour les acides gras, la durée de la dessiccation à 50° dans le vide sulfurique a varié de 3 heures à 12 heures. Elle fut même, dans une série d'essais, prolongée dans le vide sulfurique à la température ordinaire pendant 2 jours, puis la température fut portée à 100° pendant 3 heures.

Pour l'insaponifiable, la durée de la dessiccation à 50° dans le vide sulfurique fut de 3 heures, ainsi que nous l'avons indiqué précédemment, et dans certains cas, poussée jusqu'à 6 heures.

RECHERCHES ET RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Les résultats des divers dosages effectués selon les techniques indiquées sont réunis dans le tableau I.

D'autre part, une vérification s'imposait: tous nos essais d'extraction ont porté sur le précipité obtenu en versant goutte à goutte 10 cm³ de lait parfaitement homogénéisé dans 25 cm³ d'alcool acétique à 65°, comme le prescrit la méthode officielle. La totalité de la matière grasse passe-t-elle dans le coagulum ainsi formé?

Nous avons évaporé à sec, à une température inférieure à 50°, le lactosérum mélangé à l'alcool acétique et les alcools de lavage correspondant à 210 cm³ de lait. Le résidu a été épuisé à l'éther dans l'appareil de SOXHLET et nous en avons ainsi extrait 14 mgr. de matière éthérosoluble qui brunit à l'air. Ainsi l'alcool, tel qu'il est employé, dissout une petite quantité de matière grasse, contrairement aux affirmations de BORDAS et TOUPLAIN [3]. Ces auteurs écrivent en effet: « En ajoutant 10 cm³ de lait à 25 cm³ du réactif (alcool acétique), on obtient un mélange renfermant moins de 50 % d'alcool, quantité insuffisante pour dissoudre la moindre trace de beurre, celui-ci commençant seulement à se dissoudre dans de l'alcool à 60° et en proportion infime (0,02 de beurre pour 100 d'alcool à 60°). » Rapprochant le changement de teinte observé de l'instabilité des phosphatides, nous avons essayé de caractériser le phosphore par le molybdate d'ammoniaque après minéralisation. La réaction fut positive, mais ne révélait que des traces de phosphore. Cette partie éthérosoluble paraît donc être un mélange de graisses neutres et de lipoides. Elle est perdue pour le dosage. Toutefois, l'erreur que l'on commet en la négligeant est insignifiante: pour 1 litre de lait, la perte est de

$$\frac{14 \times 1.000}{210} = 66 \text{ mgr.}, \text{ ce qui correspond à une erreur relative}$$

$$\text{de } \frac{0,06 \times 100}{35} = 0,17 \%, \text{ en prenant 35 gr. comme teneur moyenne}$$

du lait en matières grasses.

TABLEAU I.

POIDS COMPARÉS DES EXTRAITS TOTAUX, ACIDES GRAS ET INSAPONIFIABLES, OBTENUS PAR L'ÉTHER ALCOOLISÉ DANS L'APPAREIL SOXHLET (MÉTHODE OFFICIELLE) ET PAR L'ALCOOL DANS LES APPAREILS SOXHLET ET KUMAGAWA.

Echantillons de lait	Matières dosées et conditions de dessiccation	Extraction éthéro-alcoolique (méthode officielle)		Extraction alcoolique		
		Extrait desséché 3 h. à 100°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°	au Soxhlet		au Kumagawa
				Extrait desséché 3 h. à 100°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°
I	Extrait total	41,1	41,9	48,3	49,1	47,2
	Acides { 3 h. dans vide à 50° ..	36,0	36,8	35,4	35,8	37,7
	gras { 6 » » » ..	36,0	35,6	35,4	34,5	36,7
	12 » » » ..	36,0	35,0	35,2	34,1	36,1
	Insap. : 3 » » » ..	1,4	1,8	»	0,9	0,5
II	Extrait total	37,7	38,9	45,8	49,0	46,0
	Acides { 3 h. dans vide à 50° ..	32,4	33,4	32,0	33,0	34,7
	gras { 8 » » » ..	31,1	33,1	30,5	31,2	33,2
	+ 24 » » à tempér. ordinaire	30,9	32,6	30,4	31,0	33,0
	+ 3 h. à 100°	30,0	31,5	29,3	30,2	32,0
	Insap. 3 h. dans vide à 50° ..	0,8	1,8	1,4	1,35	1,65
	6 » » » ..	0,45	1,5	1,15	0,95	1,35
III	Extrait total	35	36,8	38,2	39,3	36,9
	Acides { 3 h. dans vide à 50° ..	30,3	32,6	30,9	32,1	32,9
	gras {					
	Insap. : 3 » » » ..	0,55	0,65	0,9	2,0	0,35

Les résultats sont exprimés en grammes pour 1 litre de lait.

(A suivre.)