

L I P I D E S

TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE

PRINCIPAUX INDICES DES MATIÈRES GRASSES

*
* *

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE VÉGÉTALE

Dirigés par Mlle D. SCHEIDECKER

Assistée par Mlle M. BOULOUX

*
* *

O.R.S.I.O.M. Fonds Documentaire
N° 297/14 ex 1
Cote B

L I P I D E S

TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE

PRINCIPAUX INDICES DES MATIÈRES GRASSES

*
* *

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE VÉGÉTALE

Dirigés par Mlle D. SCHEIDECKER

Assistée par Mlle M. BOULOUX

*
* *

L E I T E S

Extraction à froid :

Moudre une dizaine de grammes de graines à l'aide d'un moulin à café électrique pour obtenir une poudre très fine.

Prendre de petites ampoules à décanter.

Y introduire de la laine de verre et un peu de sable.

Bien rincer le tout avec de l'éther de pétrole.

Disposer sous chaque ampoule une boîte à tare numérotée et pesée (séchée à l'étuve et pesée à froid); soit P₁.

Peser 2 g de poudre - Introduire cette prise dans une ampoule.

1°)- Remplir d'éther de pétrole; boucher; laisser 1 heure en contact.

Ensuite laisser couler l'éther et effectuer 2 ou 3 passages d'éther.

Rincer à l'éther la pointe de l'ampoule autour de laquelle une bague de matière grasse

tend à se former.

Fermer la boîte.

2°)- Recommencer une seconde fois la même opération (1 heure en contact - rinçage).

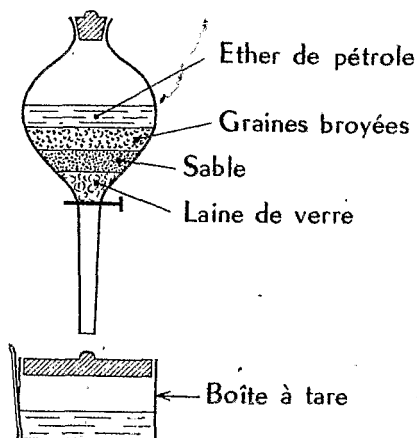
3°)- La boîte à tare est portée avec précaution dans un dessiccateur à vide et l'éther est évaporé.

On termine l'évaporation à l'étuve à une température n'excédant pas 105°C.

Laisser refroidir dans un dessiccateur.

Peser; soit P₂.

Calculs : $\frac{(P_2 - P_1) \times 100}{2} = \text{Matière grasse } \%$



Les matières grasses végétales - essentiellement constituées par des triglycérides simples et mixtes - sont extraites, à partir des tissus, par des solvants appropriés.

Dans le cas d'une étude sur le métabolisme d'une plante et les mécanismes de lipogénèse et de lipolyse, il est impossible de se contenter des résultats obtenus par pesée de l'extrait total après épuisement par un solvant. En effet, cet extrait, non seulement risque de ne pas contenir la totalité des glycérides des tissus traités, mais il renferme en outre d'autres substances n'ayant que peu ou pas de rapports avec les glycérides, surtout quand il s'agit d'organes chlorophylliens. Les erreurs peuvent être énormes dans certains cas (jusqu'à 90% de la matière grasse engagée). Pour cet ordre de recherches il faut utiliser des méthodes plus complexes et plus sélectives qu'une extraction simple par solvant: saponification de l'extrait alcoolique; séparation et dosage des acides gras totaux, libres, ou combinés à l'état de glycérides; séparation et dosage de l'insaponifiables des matières grasses (alcools gras supérieurs; stérols; alcools triterpéniques; vitamines liposolubles: A, D, E, K; caroténoïdes; autres hydrocarbures; etc.) On complète ces dosages par ceux des stérols, évalués à part (complexés avec la digitonine); du phosphore lipidique des phosphoaminolipides, etc. Quelques indications bibliographiques concernant ces techniques applicables à de vraies recherches de physiologie ou de chimie végétale figurent ci-dessous (réf. [1] [2] et [3]).

On n'envisagera ici que le cas d'organes non chlorophylliens très riches en lipides, c'est à dire l'estimation de la teneur globale en matières grasses des graines oléagineuses ou des fruits oléagineux, forme pratique sous laquelle pourra se poser le plus souvent le problème du dosage des lipides pour des généticiens. Dans ce cas, le dosage par pesée de l'extrait total après épuisement par un solvant est valable.

On peut utiliser divers solvants: éther, éther de pétrole, trichloréthylène, tétrachlorure de carbone, etc. On peut opérer par percolation à froid (cette méthode peut présenter un intérêt dans le cas d'une matière grasse particulièrement oxydable). On opère le plus généralement par extraction à chaud au Soxhlet ou au Kumagawa. On emploiera ici cette méthode sous sa forme classique, utilisée couramment pour ce genre de travail et admise dans les normes officielles d'analyse des matières grasses (réf. [4] et [5]).

...

Cette méthode - sûre et précise dans le domaine où elle est applicable - est longue, assez difficile à appliquer en série, et exige un matériel coûteux et délicat. Il y a des cas (dosages sur les graines ou les fruits récoltés dans les champs d'expérience pour le tri des variétés les plus intéressantes, etc.) ou des méthodes de dosage praticables en série avec une approximation suffisante peuvent rendre d'utiles services (réf. [6] et [7]).

DOSAGE DES MATIERES GRASSES SUR GRAINES D'ARACHIDE.

Préparation de l'échantillon

Eliminer, par un triage à la main, les fruits avariés, les graines brisées, les matières étrangères. Mélanger avec soin l'échantillon initial dont on dispose, afin de l'homogénéiser. Prélever, par réductions successives, un lot moyen de 100 fruits sur lequel on déterminera la valeur du rapport $\frac{\text{graine}}{\text{graine} + \text{enveloppe}}$. Si

l'échantillon initial est trop important, prélever de la même manière un échantillon réduit (Pour l'arachide, opérer sur 500g. environ de graines décortiquées). Décortiquer. Broyer dans un broyeur approprié, de façon à obtenir, en plusieurs stades, la mouture la plus fine possible compatible avec des conditions ne provoquant ni perte d'huile, ni perte sensible d'humidité (l'opération doit être faite sans échauffement).

Dosage de l'humidité

Aussitôt après le broyage, placer une prise de 5g. environ de graines broyées dans une boîte à tare séchée et pesée. Mettre à l'étuve à 100-105° pendant 3 heures, laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. Remettre à l'étuve une heure. Laisser refroidir et peser dans les mêmes conditions. Si nécessaire, recommencer l'opération jusqu'à poids constant.

$$\frac{\text{Poids initial prise} - \text{Poids prise séchée}}{\text{Poids initial prise}} \times 100 = \% \text{ eau des graines décortiquées.}$$

Dosage de l'huile

Aussitôt après la fin du broyage, peser 10 g. environ de graines broyées, à la balance de précision. Placer immédiatement

...

la prise d'essai dans la cartouche de l'appareil d'extraction (pour éviter les variations d'humidité ou l'oxydation de la prise d'essai).
Mettre un tampon de laine de verre sur la cartouche.

Les extracteurs continus sont recommandés. Le meilleur solvant serait un solvant carbure d'hydrogène pur: pentane ou hexane normal. Actuellement le commerce ne le fournit pas couramment. Utiliser donc de l'éther de pétrole distillant entre 40 et 60°C et ayant un indice de brome inférieur à 1.

La suite des opérations telle qu'elle est décrite ici s'entend pour un extracteur de Soxhlet de faible capacité (dimensions du ballon extracteur pour la pesée). Si l'on dispose d'un appareillage différent, les matières grasses extraites ne peuvent être pesées directement dans le ballon extracteur. Il faut les transvaser pour la distillation (appareil de Kumagawa), ou pour la pesée finale. Il est évident qu'on évite des risques d'erreur en évitant les transvasements.

Le ballon A devant recueillir les produits de l'extraction est préalablement séché et pesé à la balance de précision. Pratiquer l'extraction pendant 4 heures. Sortir alors la cartouche de l'appareil et la placer dans un courant d'air afin que la majeure partie du dissolvant qui imprègne la farine de graines soit expulsée. (Dans le cas d'huiles siccatives ou semi-siccatives qui risquent de s'oxyder à l'air, il vaut mieux opérer dans un courant de gaz inerte.)

Vider la cartouche. Triturer aussi finement que possible la farine dans un mortier, après addition d'un peu de sable siliceux fin. Placer à nouveau la farine ainsi triturée dans la cartouche, puis dans le même extracteur, en utilisant le ballon A. Extraire pendant deux heures.

Dans des conditions identiques, triturer à nouveau la farine et procéder à une troisième extraction d'une durée de deux heures, le produit de l'extraction étant recueilli à part dans un ballon B préalablement séché et taré.

De chacun des deux ballons A et B, chasser par distillation sur bain-marie bouillant, la majeure partie du dissolvant.

Eliminer les dernières traces en chauffant (à l'étuve par exemple) à une température voisine de 100°C et n'excédant pas 105°C (il peut être efficace aussi, à la fin de la distillation, de plonger brusquement le ballon jusqu'au col dans l'eau bouillante,

...

pendant quelques instants). Faciliter l'expulsion, soit en insufflant par instants de l'air (ou un gaz inerte), soit en soumettant le ballon au vide. Le chauffage ne doit pas être prolongé plus de 20 minutes. Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. Renouveler l'opération dans les mêmes conditions, jusqu'à ce que deux pesées successives ne diffèrent pas de plus de 10 mg.

Si la masse de l'huile contenue dans le ballon B n'est pas supérieure à 10 mg., on peut considérer l'opération comme terminée.

Si la masse de l'huile contenue dans le ballon B est supérieure à 10 mg, recommencer le cycle des opérations: nouvelles extractions précédées de nouveaux broyages, jusqu'à obtention d'une masse d'huile nouvelle au plus égale à 10 mg.

Vérifier que l'huile extraite est bien limpide.

Déterminer la masse de l'huile extraite en tenant compte de la dernière pesée. La masse d'huile contenue dans la prise d'essai est la somme des masses des huiles recueillies dans les ballons A et B.

(Lorsque le dosage de l'huile est effectué sur un matériel très humide, soumettre la cartouche remplie, avant de la placer dans l'extracteur, à un séchage partiel ramenant le taux d'humidité à 10% environ).

ANALYSE DE LA MATIERE GRASSE EXTRAITE

Pour obtenir des données sur la composition et le degré de pureté d'une matière grasse et, dans certains cas, pour l'identifier, on procède à l'étude de ses propriétés physiques et chimiques.

Les méthodes physiques d'examen pour l'analyse des corps gras s'attachent surtout à la détermination de la densité, du point de fusion, des points de solidification et de congélation; à l'indice de réfraction; à la solubilité et à la température critique de dissolution; à la viscosité; etc...

Les méthodes chimiques d'examen, à côté de l'étude approfondie des constituants de la matière grasse, comportent la détermination de certains "indices", dont la valeur dépend de la nature et des proportions des différents constituants.

...

Les méthodes d'examen physique ne seront pas abordées ici. Et seules seront décrites les techniques de détermination de trois des principaux indices. Pour les méthodes d'étude des caractères physiques, les définitions et les techniques relatives aux autres indices, se reporter au chap. III du Tome III du Traité pratique de chimie végétale de Brunel et aux publications relatives aux méthodes normalisées (réf. [4] et [5]).

Détermination de l'acidité et de l'indice d'acide.

(Référence: AFNOR - NF - T - 60 - 204)

La détermination de l'acidité des corps gras renseigne sur leur degré d'hydrolyse. Les matières grasses fraîches ne contiennent que très peu d'acides gras libres. L'acidité est une variable qui dépend essentiellement des conditions de conservation et d'extraction.

Il y a deux manières d'exprimer la teneur d'une matière grasse en acides gras libres: l'acidité et l'indice d'acide.

Ces deux caractéristiques d'une même propriété sont mesurées de la même façon. Seuls les résultats du dosage sont exprimés différemment. Dans tous les cas, ces déterminations se font sur la matière grasse séchée et purifiée.

Cependant, pour les produits contenant des acides gras volatils, on détermine l'acidité sur le produit tel quel, en précisant, à part, le degré d'humidité et en rapportant l'acidité au produit sec. En présence d'acides minéraux libres ou combinés, on peut être conduit à faire des déterminations spéciales.

Définitions. L'acidité est le pourcentage d'acides gras libres exprimé conventionnellement, selon la nature des corps gras, en acide oléique, palmitique ou laurique.

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes de potasse caustique KOH nécessaire pour neutraliser l'acidité libre de un gramme de matière grasse séchée et purifiée.

Principe. Titrer l'acidité de produit dissous par une solution alcaline alcoolique en présence de phénol-phtaléine.

Réactifs. Mélange à parties égales d'alcool éthylique à 95° et d'oxyde d'éthyle, neutralisé à l'aide d'une liqueur alcaline décimale (quelques gouttes devront suffire). Ou, à défaut,

...

alcool éthylique à 95° neutralisé. [Dans le cas des substances à haut point de fusion, il pourra être bon de remplacer l'alcool éthylique par l'alcool butylique]

- Solution alcaline alcoolique (potasse ou soude) N/2 (ou N/10 dans le cas d'une faible acidité).
- Phénolphtaléine en solution à 1% dans l'alcool.

Mode opératoire. Prélever 10 g. environ de la matière grasse à titrer, décantée et filtrée sur papier. Les dissoudre dans 100cc. du mélange alcool-oxyde d'éthyle (ou 100cc alcool).

Agiter et procéder au titrage avec la solution alcaline alcoolique, en présence de phénolphtaléine, à la température ordinaire.

La coloration rouge doit subsister quelques secondes après l'addition des dernières gouttes de réactifs.

Expression des résultats. L'acidité peut être exprimée conventionnellement, selon la nature des huiles, en acides oléique, palmitique ou laurique, d'après le tableau de correspondance suivant:

Poids moléculaire de l'acide oléique:	282
" " " " palmitique:	256
" " " " laurique:	200

Soient m la masse en grammes de la prise d'essai,
n le volume de liqueur alcaline nécessaire à la neutralisation et exprimé en cc. de liqueur normale;

Les différentes expressions de l'acidité seront données par les formules:

$$A(\text{oléique}) = \frac{n \times 0,282 \times 100}{m}$$

$$A(\text{palmitique}) = \frac{n \times 0,256 \times 100}{m} \quad (\text{concerne particulièrement l'huile de palme})$$

$$A(\text{laurique}) = \frac{n \times 0,200 \times 100}{m} \quad (\text{concerne particulièrement les huiles de coprah, de palmiste et de laurier})$$

...

(Dans le cas où le résultat fait mention du terme "acidité" sans indication du mode d'expression, il s'agit toujours, par convention, de l'acidité exprimée en acide oléique).

L'indice d'acide est donné avec une approximation suffisante par la formule:

$$\frac{n \times 56}{m}$$

étant donné que le poids moléculaire de la potasse caustique est 56,11.

(Il se trouve que l'indice d'acide est le double du nombre exprimant l'acidité, quand celle-ci est exprimée en acide oléique).

Précision des résultats. La précision des résultats est de l'ordre de 0,02 avec une solution alcaline alcoolique N/10 et de l'ordre de 0,20 avec une solution N ou N/2.

Mesure de l'Indice de Saponification

(Référence: AFNOR - NF - T - 60 - 206)

L'indice de saponification est une constante des huiles et des graisses, mais il ne permet pas leur identification, la plupart ayant un indice compris entre 190 et 200.

Il est d'autant plus élevé que les glycérides sont formés d'acides gras de faible poids moléculaire. Il dépend de la teneur en insaponifiable, en acides gras libres et de la proportion de mono-, di- et tri-glycérides. Il permet, lorsque la matière grasse renferme uniquement des triglycérides, de déterminer la teneur pour cent en acides gras totaux.

Définition et Principe. L'indice de saponification est le nombre de milligrammes de potasse caustique KOH nécessaires pour transformer en savon les acides gras et les glycérides d'un gramme de corps gras.

Réactifs. - Solution d'acide chlorhydrique N/2.

- Solution N/2 de potasse dans l'alcool éthylique à 95° exempt d'aldéhyde. Cette solution est décantée après repos et conservée dans un flacon en verre brun ou jaune convenablement bouché.

- Phénolphtaléine en solution à 1% dans l'alcool.

...

Mode opératoire. Peser au milligramme, dans un erlen ou dans un ballon à fond plat taré, deux grammes de matières grasses (dont on a éliminé l'eau et les impuretés).

Ajouter 25 cc, exactement mesurés, de potasse alcoolique N/2 et porter à l'ébullition sous un réfrigérant à reflux. Ajouter dans l'erlen ou le ballon un régulateur d'ébullition (billes de verre, etc.) Maintenir l'ébullition pendant une heure en agitant de temps en temps (prolonger l'ébullition dans le cas des corps à haut point de fusion). Titrer l'excès d'alcali dans la solution savonneuse chaude avec HCl N/2 en présence de phénolphthaléine.

(Faire un essai à blanc dans les mêmes conditions pour titrer la liqueur alcoolique de potasse).

Expression des résultats. Soient M la masse en grammes de la prise d'essai.

- C₁ le nombre de cc. HCl utilisés dans l'essai à blanc.
C₂ le nombre de cc. HCl utilisés dans l'essai avec matières grasses.

L'indice de saponification est donné par la formule:

$$\frac{(C_1 - C_2) \times 28}{M}$$

(1 cc HCl N/2 → 28 mg KOH)
(On l'exprime sans décimales)

Precision de la méthode. En raison de l'influence de la durée d'ébullition, elle est de l'ordre de 2 à 3 unités.

Mesure de l'Indice d'Iode

L'indice d'iode exprime le degré d'insaturation du corps gras.

Sa valeur a permis de classer grossièrement les huiles en 3 grandes catégories:

- huiles siccatives (indice d'iode compris entre 150 et 190)
- " demi-siccatives (" " " " 100 " 150)
- " non- " (" " " " 75 " 100)

En principe, il suffit pour le déterminer de faire agir un halogène en solution sur une matière grasse, elle-même en solution

dans un solvant indifférent.

Cependant l'iode seul réagit trop lentement et l'on emploie généralement des combinaisons halogénées de l'iode (chlorure ou bromure d'iodé) pour accélérer la réaction tout en évitant les réactions de substitution.

Différentes méthodes ont été proposées; elles diffèrent essentiellement par la nature de la solution halogénante. Les trois principales sont:

- La méthode de Hübl: qui utilise une solution d'iode et de chlorure mercurique dans l'alcool.
- " " " Hanus: qui utilise une solution de monobromure d'iode dans l'acide acétique.
- " " " Wijs : qui utilise une solution de monochlorure d'iode dans l'acide acétique.

Les deux dernières méthodes donnent des résultats pratiquement identiques, tandis que la première donne généralement des résultats trop faibles. En outre, le réactif de Hübl n'est pas absolument stable.

Définition. L'indice d'iode est le nombre de grammes d'iode fixé sur les doubles liaisons de 100 grammes de corps gras. Il est habituellement désigné par I.I.

Méthode de Hanus.

(Référence: Brunel, Traité pratique de Chimie Végétale, T.IV, P.282).

Principe. On fait agir une solution halogénante sur le produit préalablement dissous dans du tétrachlorure de carbone (ou du chloroforme). On ajoute de l'iodure de potassium et on titre en retour avec une solution de thiosulfate de sodium.

La solution halogénante est une solution de monobromure d'iode dans l'acide acétique.

Réactifs. - Chloroforme ou tétrachlorure de carbone.
- Réactif de Hanus (10g. de monobromure d'iode dans 500cc d'acide acétique cristallisable, pur et exempt d'alcool - se conserve en flacon bouché émeri, jaune de préférence)

...

- Iodure de potassium pur (exempt d'iode libre et d'iodate) en solution à 10%.
- $S^{2}O^{3}Na^{2}$ N/10

Mode opératoire. Dans une fiole conique bien sèche de 200cc, bouchant à l'émeri, introduire une prise d'essai convenable de la substance (le poids de la prise d'essai est déterminé par l'indice d'iode de la substance, on prend de préférence 32g./I.I.) exactement pesée et 10cc. de chloroforme ou de tétrachlorure de carbone. Agiter le mélange jusqu'à dissolution complète et ajouter 25cc. exactement mesurés de réactif. Boucher, agiter et abandonner le mélange 1 heure à l'obscurité. Puis ajouter 20cc d'une solution à 10% d'iodure de potassium, 100cc environ d'eau distillée et titrer l'iode libre au moyen d'une solution de $S^{2}O^{3}Na^{2}$ N/10.

Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

Calculs. Soient n le nombre de cc de $S^{2}O^{3}Na^{2}$ N/10 utilisé pour l'essai à blanc
 n' le nombre de cc de $S^{2}O^{3}Na^{2}$ N/10 utilisé pour la prise d'essai
 μ le poids de cette prise d'essai

l'indice d'iode est égal à:

$$\frac{(n - n') \times 1,269}{\mu}$$

(1 cc $S^{2}O^{3}Na^{2}$ N/10 correspond à 126 mg d'I. d'où

$$\left(\frac{(n - n') \times 0,0126 \times 100}{\mu} \right)$$

Remarque. Pour l'indice d'iode, en même temps que les résultats, indiquer toujours la méthode utilisée.

Bibliographie

Techniques de dosages applicables à des recherches chimiques et physiologiques sur le métabolisme des lipides.

- [1] - Kumagarva - Suto, Biochem. Zeitschr. 8 - 1907.-
[2] - Lemeland - Bull. Soc. Ch. Biol., 110-124 - 1923.-
[3] - Ch. Pontillon - Contribution à l'étude physiologique des lipides du Sterigmatocystis nigra .
Rev. gén. Bot. 44 - 1932.-

Techniques de dosages applicables à l'estimation de la teneur en matières grasses des graines oléagineuses.
Analyse de ces matières grasses.

- [4] - Méthodes unifiées pour l'analyse des matières grasses,
3ème Rapport de la commission internationale pour l'étude des matières grasses - 1948 (à la Maison de la Chimie, 28, rue St Dominique, Paris VII° - actuellement épuisé)
[5] - Normes de l'AFNOR: - NF - V - 03 - 901 (Déc. 1950)
- NF - T - 60 - 201 à 212 (Juin 1948)
(Vente: 19, rue du 4 Septembre, Paris, II°)
[6] - E. André et Marie Carbouères - Les méthodes de dosage des Lipides dans les graines oléagineuses (Méthode par lixiviation - Méthode par macération - Méthode par pesée des restes deshuilés - Essais de détermination en série) -
Oléagineux - N°7 - p.441-9 - 1953.-
[7] - P.M. Rousseau - Un procédé simple de dosage de la matière grasse des grignons d'olive (Dosage par flacons-doseurs)
Oléagineux - N°6 - p.651-655 - 1951.-
