

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

no 209 11241

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

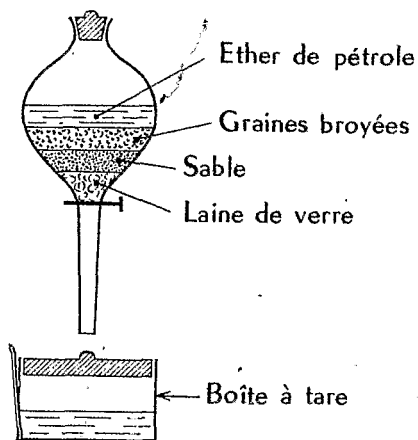
*
* *

L I F I N 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 F_1 .

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 au-
tour de laquelle une bande de 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

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.

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 phy-

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

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 sels à haut point

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.-
