

CHIMIE VEGETALE

EXTRACTION ET DOSAGE DES LIPIDES

\*

\* \*

Travaux Pratiques de Physiologie Végétale

Dirigés par Mlle D. SCHEIDECKER  
Assistée par Mlle M. BOULOUX

\*

\* \*

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire  
N° : 29713ex1  
Cote : B

CHIMIE VÉGÉTALE

EXTRACTION ET DOSAGE DES LIPIDES

\*

\* \*

Travaux Pratiques de Physiologie Végétale

Dirigés par Mlle D. SCHEIDECKER  
Assistée par Mlle M. BOULOUX

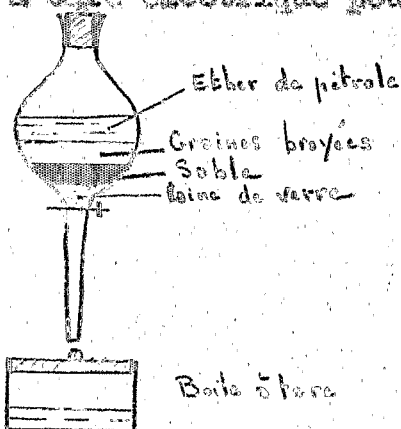
\*

\* \*

L I P I D E S

Extraction à froid.

Moudrez 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'ether de pétrole.

Disposer sous chaque ampoule une boîte à tare numérotée et pesée (séchée à l'étuve et pesée à froid), soit P<sub>1</sub>.

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

1/ Remplir d'ether de pétrole, boucher, laisser 1 h. en contact.

1/ Remplir d'ether de pétrole, boucher, laisser 1 h. en contact.

Ensuite laisser couler l'ether et effectuer 2 ou 3 passages d'ether. Rincer à l'ether la pointe de l'ampoule autour de laquelle une bague de matière grasse tend à se former. Rompre la boîte.

2/ Recommencer une seconde fois la même opération (1 h. en contact = rinçage).

3/ La boîte à tare est portée avec précaution dans un dessiccateur à vide et l'ether est évaporé. On termine l'évaporation à l'étuve à une température n'excédant pas 40°. Laisser refroidir dans un dessiccateur. Peser. Soit P<sub>2</sub>.

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

=====  
 1958

Cette méthode d'extraction et de dosage des lipides convient à des travaux de recherches de chimie et de physiologie végétale. Elle s'applique à n'importe quel matériel, chlorophyllien ou non (avec quelques exceptions cependant: matériel très riche en résines par exemple).

Elle a été mise au point par Pontillon dans sa thèse sur les lipides du *Sterigmatocystis nigra*, et reprise par Mlle Gertrude dans sa thèse sur le métabolisme et la morphogénèse de *Veronica anagallis* (voir Références).

### DEFINITIONS

Le contenu précis du terme "Lipides" a donné lieu à de nombreuses tentatives de définition.

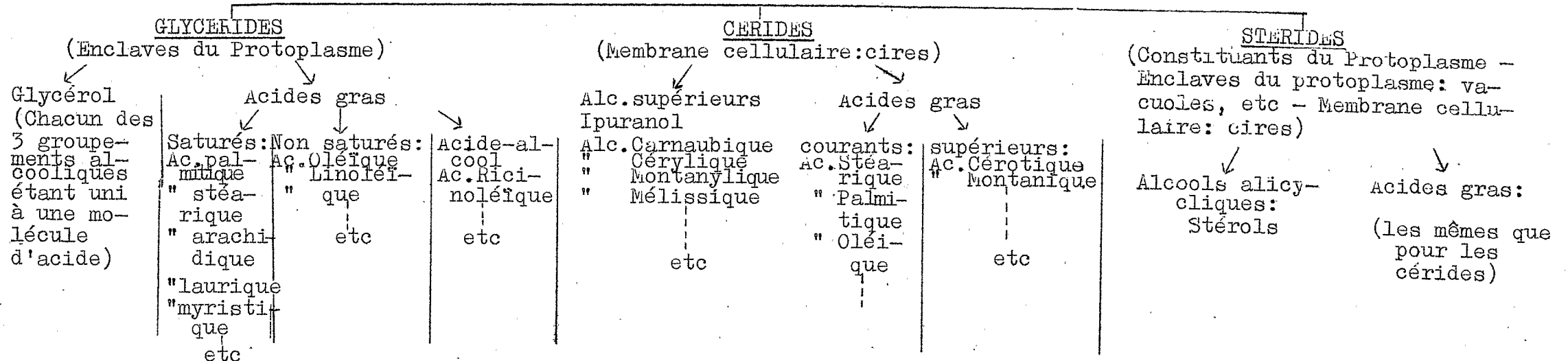
Pontillon propose: "Substances à caractère typiquement organique possédant dans leur molécule une ou plusieurs fonctions ester facilement hydrolysables en radicaux aliphatiques ou alicycliques".

Les lipides comprennent: les lipides ternaires, contenant carbone, hydrogène et oxygène, et les lipides complexes, où figurent en outre soit le phosphore, soit le phosphore et l'azote.

Le tableau quivant (qui n'a pas la prétention d'être absolument complet) rappelle la classification et la constitution chimique des principaux groupes de lipides qui se rencontrent chez les végétaux, ainsi que leur localisation dans la cellule végétale.

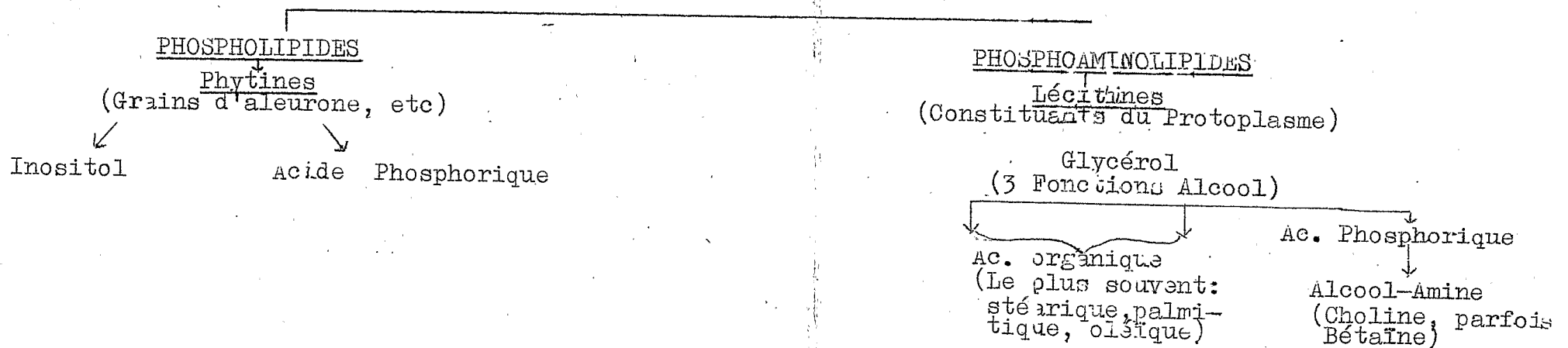
...

LIPIDES TERNAIRES  
(Carbone, Hydrogène, Oxygène)



(On peut ajouter à cette liste les ESTOLIDES des cires de Conifères qui résultent de l'estérification, molécule à molécule, d'acides alcools de poids moléculaire élevé)

LIPIDES COMPLEXES  
(Carbone, Hydrogène, Oxygène, Phosphore, Azote)



### PRINCIPES DE LA METHODE

Pour une étude physiologique, et surtout quand il s'agit d'organes chlorophylliens, il est impossible de se contenter des résultats obtenus par pesée de l'extrait total après épuisement par un solvant. Des substances non lipidiques sont entraînées. Et toutes les matières grasses risquent de ne pas être dissoutes. L'erreur peut, dans certains cas, être énorme.

Il est impossible également de partir de matériel séché. Le chauffage à 100-110° modifie considérablement les caractéristiques des graisses et entraîne des pertes sérieuses.

En 1907-8, Kumagawa et Suto ont mis au point la méthode qui consiste à doser les lipides par pesée des acides gras provenant de la saponification d'un extrait obtenu par l'alcool bouillant. Depuis, de nombreuses modifications de détail ont été introduites, mais le principe de la méthode reste valable.

La marche des opérations, telle qu'elle a été mise au point par Pontillon, est résumée dans le tableau ci-dessous.

Le matériel frais est fixé et épuisé à l'alcool bouillant. Le liquide d'extraction contient, outre les matières grasses, d'autres constituants de la matière végétale: glucides, chlorophylle, etc. L'alcool est éliminé par distillation.

Le résidu du lot destiné à l'estimation du phosphore entrant dans la constitution des molécules de lipides complexes est repris, pour purification, par l'éther sulfurique. Après filtration, cet éther est éliminé et le phosphore est dosé sur ce dernier résidu, par les méthodes habituelles, après une attaque sulfo-nitrique classique.

Le résidu du lot destiné au dosage des acides gras et des insaponifiables des corps gras est soumis à l'action de la potasse alcoolique à chaud. Les matières grasses sont saponifiées. On obtient une solution hydroalcoolique renfermant le glycérol, les autres alcools, etc., et le mélange des sels alcalins des acides gras. Cette saponification, facile pour les glycérides, s'opère plus difficilement pour les cires (il peut être nécessaire de la faire à l'autoclave).

...

MARCHE DES OPERATIONS

MATERIEL VEGETAL FRAIS

- Lavage à l'eau distillée
- Division en petits fragments
- Lot homogénéisé
- Partage en deux lots égaux

LOT 1

- Fixation
- Extraction
- Distillation du solvant
- Saponification
- Traitement de la sol. de savons par l'éther de pétrole.

SOLUTION HYDROALCOOLIQUE DE SAVONS

- Reprise par HCl concentré
- Traitement par l'éther de pétrole
- Filtration
- Evaporation du solvant
- Pesée

ACIDES GRAS TOTAUX

INSAPONIFIABLES EN SOL. DANS L'ETHER DE PETROLE

- Distillation de l'éther de pétrole
- Reprise par l'éther de pétrole
- Filtration
- Evaporation du solvant
- Pesée

INSAPONIFIABLES TOTAUX

- Reprise par la digitonine
- Filtration
- Pesée

STEROLS

LOT 2

- Fixation
- Extraction
- Distillation du solvant
- Reprise par l'éther sulfurique
- Elimination de l'éther sulfurique
- Attaque sulfonitrique
- Dosage du phosphore

PHOSPHORE LIPIDIQUE

Cette solution est alors traitée par l'éther de pétrole qui entraîne l'ensemble des insaponifiables des corps gras (alcools gras supérieurs; stérols; alcools triterpéniques; vitamines liposolubles: A, D, E, K; caroténoïdes; autres hydrocarbures; etc.) Le glycérol, miscible à l'eau et à l'alcool, mais insoluble dans l'éther, reste dans la phase hydroalcoolique, qui est séparée par décantation de la phase étherée renfermant les insaponifiables. L'éther de pétrole est éliminé par distillation. Le résidu est repris, pour purification, par une nouvelle quantité d'éther de pétrole, qui est, lui aussi, éliminé, après filtration. Le poids du résidu représente la teneur globale en insaponifiables.

Ici, seuls les stérols seront dosés à part. Pour les séparer, on reprend le résidu d'insaponifiables par la digitonine qui forme un complexe avec les stérols.

Pour l'estimation de la teneur en acides gras totaux, on reprend la solution hydroalcoolique qui contient encore le glycérol et le mélange des sels alcalins des acides gras. Par addition d'acide chlorhydrique, on précipite les acides gras, insolubles dans l'eau, et on les sépare du mélange par un traitement à l'éther de pétrole. La phase étherée est séparée par décantation de la phase hydro-alcoolique, puis filtrée. On élimine le solvant. Le poids du résidu représente la teneur en acides gras totaux, libres ou combinés. L'analyse n'est pas poussée plus loin ici (voir Références).

#### DISCUSSION DE LA METHODE

Cette technique présente cependant un inconvénient: celui de ne pas fournir les lipides à l'état naturel et d'empêcher par là certaines études qualitatives.

On lui a fait d'autre part un certain nombre d'objections. Pontillon en examine les principales dans son travail:

1) Une éthanolyse pourrait se produire au cours de l'extraction. Ethanolyse qui serait susceptible de modifier profondément les résultats. Rien ne prouve cependant que cette alcoololyse se produise: elle n'a lieu en effet qu'en milieu rigoureusement anhydre et fortement acide. Or, au cours de l'extraction au Kumagawa, le milieu n'est jamais anhydre et l'acidité n'est qu'une acidité organique. Et Pontillon précise:

" Emerson et Dumas ne signalent au cours de l'ébullition prolongée de graisses naturelles dans l'alcool qu'une légère



estérification des acides gras libres. D'autre part, en supposant que cette éthanolyse se produise, ce qui nous le répètons, n'est pas démontré, elle ne nuirait en rien à l'exactitude des résultats: ce n'est pas l'extrait alcoolique qui est pesé, mais les acides gras qui résultent de la saponification de cet extrait, et, s'il s'était formé pendant l'extraction des esters éthyliques, ceux-ci seraient détruits par la saponification".

2) L'extraction serait incomplète. Les auteurs cités ont vérifié que ce n'était pas le cas pour le matériel qu'ils étudiaient. Il est évident que pour chaque nouvelle étude et pour chaque matériel une vérification s'impose par épuisement à l'éther au Soxhlet. Dans le cas de *Sterigmatocystis nigra*, Pontillon a constaté que le résidu, peu abondant, obtenu ne contenait ni acides gras, ni stérols.

3) Il pourrait y avoir entraînement d'une certaine quantité de résines dont la présence dans les insaponifiables (résines et résinotannols) et dans les acides gras (acides résinologiques) peut conduire à des résultats erronés. Ce reproche est fondé dans le cas de matériel riche en résines, bien que la quantité de résines entraînées ne soit jamais très considérable vu la solubilité assez réduite de ces substances dans l'éther de pétrole. Pontillon ajoute que: "Le lavage des produits avec une solution d'hydrate de chloral à 60% ne peut se recommander, car si l'hydrate de chloral est un bon solvant des résines, c'est également un solvant des stérols."

Il indique également que: "Pour éviter la saponification toujours possible des résines, il serait peut être utile de réduire un peu la durée de la saponification, mais nous n'avons fait aucun essai dans ce sens."

D'autre part, l'alcool amylique, recommandé par certains auteurs comme solvant pour la saponification, paraît à rejeter par suite de son point d'ébullition trop élevé (102-148°C).

#### TECHNIQUE

##### Produits nécessaires

- Alcool absolu
- Alcool 95°
- Alcool 80°
- Alcool 50°

- Ether de pétrole distillant entre 50 et 70°.
- Ether de pétrole distillant audessous de 50°.
- Solution alcoolique (95°) de potasse 2 N (non titrée).
- Solution aqueuse de potasse N/10 (non titrée).
- Acide chlorhydrique concentré.
- Acétone pur et sec.
- Ether sulfurique absolument exempt d'alcool et d'eau (Pour avoir de l'éther anhydre il suffit de mettre quelques pastilles ou quelques fragments de soude ou de potasse caustique au fond du flacon).
- Amiante en poudre.
- Sable de Fontainebleau (Lavé).
- Coton de verre .
- Suspension de dititonine à 2% dans l'alcool à 80°. (Il est extrêmement difficile de se procurer de la digitonine en France. S'adresser à Merck. Ou en Suisse).
- Produits nécessaires pour l'attaque sulfo-nitrique et le dosage du phosphore (voir fascicule "Éléments minéraux").

#### Matériel nécessaire

En plus de la verrerie courante et du matériel courant:

- Un appareil extracteur de Kumagawa. Le modèle avec ballon de 500cc, pour emploi de cartouches de 37 x 130 mm convient bien.
- Cartouches en cellulose pure.
- Ballons et réfrigérants pour la distillation sous vide des solvants.

1) Pour la distillation de l'alcool il est commode de se servir non pas d'un ballon à tubulure latérale soudée au col, mais d'un ballon ordinaire surmonté d'un tube à deux boules, la tubulure latérale de dégagement étant soudée au sommet de ce tube, au dessus des boules. Ce dispositif évite les pertes possibles par la tubulure latérale. Il est d'autant plus utile ici que l'emploi d'un ballon ordinaire dispense, au moment de la saponification, de l'utilisation d'un réfrigérant spécial (réfrigérant de Hopkins descendant très bas dans le col du ballon de façon à éviter pendant l'ébullition toute perte de vapeur par la tubulure latérale).

Un tube capillaire traverse le tube à boules pour plonger dans le ballon, augmentant ainsi la surface de chauffe et régularisant l'ébullition du liquide.

2) Pour la distillation de l'éther il est commode de disposer d'un chauffe-ballon électrique permettant le chauffage direct du ballon.

Il est bien entendu indispensable de régler la température

du chauffe-ballon avant la distillation (avec un autre récipient contenant le même solvant par ex.)

- Ampoules à décanter de 500cc.
- Dessiccateur à vide. Il est recommandé de le garnir de potasse en plaques, pour que l'évaporation de l'éther soit plus rapide.
- Entonnoir d'analyse à tige longue et fine.
- Pour les filtrations sur sable et amiante, on peut utiliser le dispositif suivant: Placer au fond d'un entonnoir ordinaire un tampon de coton de verre, puis une couche de sable de Fontainebleau lavé de 2 à 3 cm d'épaisseur. Faire une suspension d'amiante en poudre dans l'eau distillée. La verser doucement sur le sable, de manière à ce qu'il se dépose un film continu de pâte d'amiante à la surface du sable. Régler la quantité d'amiante d'après les besoins de la filtration. Laver avant usage ce système filtrant à l'eau distillée, puis à l'éther.
- Filtres Durieux 111, bande bleue (filtration lente).
- Filtres Durieux 111, bande verte (sans graisse).
- Filtre de Buchner, en porcelaine, pour filtration sous vide.

#### Préparation et Fixation du Matériel

Le matériel frais est lavé à l'eau distillée et séché au papier Joseph. Il est divisé en petits fragments, bien mélangés pour constituer un tout homogène. Prélever un premier lot sur lequel on déterminera la teneur en eau. Prélever ensuite deux lots identiques qui seront fixés immédiatement dans 10 fois leur poids d'alcool à 95° bouillant. Maintenir l'ébullition environ 15 minutes. Pour un matériel peu riche en lipides (plantes et tissus sans réserves lipidiques), on peut opérer commodément sur des lots de 40 à 50 grammes de matière végétal fraîche.

#### Extraction

Le début de l'opération est le même pour les deux lots:

- Séparer le matériel fixé de l'alcool de fixation, sur Buchner et papier filtre sans graisse.
- Broyer.
- Mettre le matériel broyé dans une cartouche de cellulose pure. Epuiser par une quantité convenable d'alcool à 95°, dans l'appareil de Kumagawa, pendant 8 heures.  
(Placer un anneau de verre sous la cartouche pour éviter qu'elle ne fasse ventouse dans le fond du panier. Placer le filtre qui vient de servir sur le Buchner, sur le dessus de la cartouche: pour éviter que des fragments végétaux entraînés par l'alcool ne viennent boucher le siphon et pour éviter qu'il n'y ait perte de lipides retenus par le filtre).

- Transvaser quantitativement l'extrait alcoolique joint à l'alcool de fixation dans un ballon à distiller et évaporer sous vide à une température ne dépassant pas 70°.

La distillation de l'extrait destiné à la saponification n'est poussée que jusqu'à consistance sirupeuse.

La distillation de l'extrait devant servir au dosage du phosphore lipidique est poussée jusqu'à siccité.

Pour obtenir la siccité parfaite, un bon moyen consiste à ajouter, à la fin de la distillation, 10cc d'alcool absolu dans le ballon. Faire le vide le plus poussé que peut donner le trompe. Remettre le ballon au bain-marie à 70°, et enfin le plonger jusqu'au col dans l'eau bouillante pendant 1 ou 2 minutes quand presque tout l'alcool a été distillé.

#### Dosage du Phosphore Lipidique

Le résidu sec destiné à cet usage est traité à plusieurs reprises par de l'éther sulfurique absolument exempt d'alcool et d'eau, et légèrement chauffé. La solution étherée est recueillie dans un matras de Kjeldahl et l'éther évaporé sous vide à basse température; le résidu de l'évaporation est alors soumis à la destruction sulfo-nitrique.

Il faut noter qu'une reprise benzénique peut-être utile après les reprises étherées.

(Pontillon recommande de procéder comme suit pour l'attaque:

- Ajouter 25 cc d'acide nitrique et laisser digérer 24 heures à la température du laboratoire.  
Cette opération peut être réduite à une durée de 30 minutes, en cas de besoin, en chauffant légèrement jusqu'au moment où l'attaque paraît se ralentir, puis en laissant refroidir.
- Ajouter ensuite 5cc d'acide sulfurique et poursuivre l'attaque comme d'habitude.
- Doser le phosphore sur le produit de l'attaque suivant les méthodes habituelles.

#### Saponification

Le résidu de l'autre extrait, qui a été amené à consistance sirupeuse, est additionné de 50 cc. de potasse alcoolique 2 N.

- Prendre les précautions nécessaires, le cas échéant, pour qu'il n'y ait pas de perte de vapeur par la tubulure latérale du ballon (voir plus haut).

- Chauffer deux heures au bain-marie bouillant, sous réfrigérant.
- Ajouter 45 cc d'eau distillée.
- Chauffer encore pendant 15 minutes.
- Laisser refroidir.
- Transvaser la solution hydro-alcoolique obtenue dans une ampoule à décantation de 500cc. Laver soigneusement le ballon avec de l'alcool à 50°.

#### Séparation et dosage des insaponifiables totaux

- Traiter la solution hydro-alcoolique par 100, puis 50, et enfin 40cc d'éther de pétrole distillant entre 50 et 70°, chaque lavage étant suivi d'une décantation.
- Transvaser l'éther de pétrole renfermant les insaponifiables en solution dans une ampoule à décanter de 500cc.
- Laver cet éther de pétrole par 50cc d'une solution aqueuse N/10 de potasse, puis par 40cc d'eau, chaque lavage étant suivi d'une décantation. Joindre ces liqueurs de lavage à la solution hydro-alcoolique de savons.
- Transvaser l'éther de pétrole renfermant les insaponifiables dans un ballon à distiller de 500cc. et distiller l'éther de pétrole sous vide, à basse température.
- Reprendre le résidu obtenu par de l'éther de pétrole distillant au dessous de 50°, ajouté par petites fractions en lavant le col et les parois du ballon.  
(Certains auteurs disent d'utiliser 10 cc. d'éther de pétrole pour cette reprise, mais cette quantité semble assez souvent insuffisante pour dissoudre tous les insaponifiables. On pourra en utiliser un peu plus).
- Laisser reposer 15 à 20 minutes.
- Filtrer l'éther de reprise sur amiante et sable dans un petit cristalliseur à bec ou un petit bécher préalablement taré.
- Laver soigneusement le ballon et le filtrer avec quelques cc. d'éther de pétrole et le joindre au contenu du cristalliseur ou du bécher.
- Mettre ce récipient dans un dessiccateur et faire le vide.
- Après évaporation complète de l'éther de pétrole, le récipient est laissé environ une heure à l'étuve à 50°. Puis pesé.

La différence entre la pesée et le poids du cristalliseur vide donne le poids des insaponifiables totaux.

### Séparation et dosage des Stérols

- Dissoudre les insaponifiables dans 20cc d'acétone pur et sec additionnés de 10 cc d'une suspension de digitonine à 2% dans l'alcool à 80°.
- Chauffer au bain-marie, en évitant l'ébullition, jusqu'à réduction du volume de moitié.
- Abandonner 15 minutes à la température du laboratoire.
- Séparer le précipité sur un filtre Durieux N°111, bande bleue, préalablement taré et placé sur un entonnoir à longue tige fine.
- Laver le filtre 10 fois à l'eau bouillante, 1 fois à l'alcool à 80°, 1 fois à l'acétone, 1 fois à l'alcool à 80°, et enfin une fois à l'éther anhydre.

Faire les filtrations très rapidement, en couvrant bien le précipité chaque fois. Le filtrat n'est pas limpide.

- Après les lavages, détacher le filtre, le mettre dans un vase à tare, faire sécher à 100° (3 heures suffisent en général), laisser refroidir dans un dessiccateur, puis peser.

Le poids obtenu est multiplié par 0,25 pour l'évaluation des stérols.

### Séparation et dosage des acides gras totaux

- Ajouter à la solution hydroalcoolique de savons 10cc d'acide chlorhydrique concentré pour libérer les acides gras.
- Puis traiter par l'éther de pétrole distillant entre 50 et 70°, dans les mêmes conditions que pour la séparation des insaponifiables.
- Laver avec de l'eau pour enlever les traces d'acide chlorhydrique.
- Distiller l'éther de pétrole sous vide, à basse température.
- Reprendre l'extrait sec obtenu par de l'éther de pétrole distillant au-dessous de 50°. Filtrer sur amiante et sable dans les mêmes conditions que ci-dessus. Toute la suite des opérations est semblable à ce qui a été fait pour les insaponifiables.

L'évaluation des acides gras totaux est obtenue par pesée.

...

R E M A R Q U E S

- Il ne doit y avoir de traces d'eau nulle part au cours des manipulations. La verrerie doit être rigoureusement sèche.
- Au lieu de partir de deux lots distincts de matériel frais, l'un pour le dosage du phosphore lipidique, l'autre pour celui des acides gras et des insaponifiables, on peut ne faire qu'une fixation et une extraction sur un lot plus important, et partager ensuite l'extrait alcoolique en deux parties égales.

\* \* \* \*

\* \* \*

R E F E R E N C E S

Exposé et utilisation de la méthode:

- Ch. Pontillon - Contribution à l'étude physiologique des lipides du *Sterigmatocystis nigra*.  
Rev. Gén. Bot. - 44.- 1932.-
- M. Th. Gertrude - Métabolisme et Morphogénèse en milieu aquatique.  
Lib. Gén. Enseignement, Paris - 1937.-

\*

\* \*

Pour une analyse plus approfondie de l'insaponifiable des corps gras, une étude récente a paru dans la revue "Oléagineux" :

- René Lombard - L'insaponifiable des corps gras.-

5 Articles ont paru sous ce titre général:

- I - Nature, définition, méthodes d'étude.  
Oléagineux, N°4, 1951 - P.195-202.-  
(Exposé des techniques de chromatographie et de distillation moléculaire)
- II - Monographie des constituants de l'insaponifiable.  
Oléagineux, N°5, 1951 - P.268-274.-
- III- Méthodes d'analyse dans le domaine de l'insaponifiable.  
Oléagineux, N°7, 1951 - P.395-401.-
- IV- Obtention et applications de l'insaponifiable et de ses constituants.  
Oléagineux, N°10, 1951 - P.587-595.-
- V - Obtention du  $\beta$ -carotène. Industrie des vitamines.  
Oléagineux, N°11, 1951 - P.645-650.-

\*

\* \*

...



Pour une analyse plus approfondie des acides gras:

- Pontillon donne, dans son travail, des indications pour la séparation et l'identification des différents acides gras.
- On peut citer parmi les travaux plus récents, utilisant beaucoup des techniques chromatographiques:
- G.Nunez et J.Spiteri - Chromatographie de partage des substances liposolubles:  
I - Séparation des acides gras supérieurs.  
Bull. Soc. Chim. Bio. XXXV - N°8 -  
P.851-8 - 1953 -
- G.N. Catravas - La Chromatographie et ses applications pour la séparation des acides gras.  
Oléagineux, 1954, N°1 (Fasc.81); P.21-27.-

\*

\* \*

Pour des renseignements sur les caractéristiques des différentes huiles d'origine végétale:

- H. Mensier. - Lexique des huiles végétales.-  
I.R.H.O. - Série scientifique N°2 - 1946.-  
Soc. d'éd. techniques coloniales.-

\*\*\*\*\*