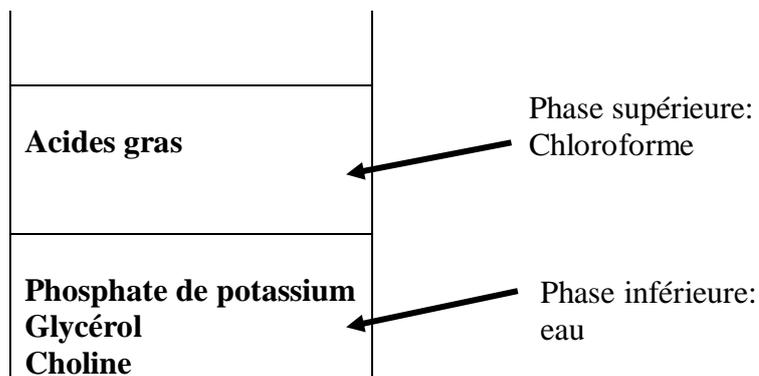


Après acidification:

- Les savons se transforment en acides gras: $R - COO^-K^+ \longrightarrow R - COOH$
Les acides gras sont insolubles dans l'eau, ils passent dans la phase chloroformique
- Le phosphate de potassium se transforme en acide phosphorique (H_3PO_4), **soluble dans l'eau**
- La choline et le glycérol ne vont pas changer. Ils restent dans la phase aqueuse.



Intérêt de l'expérience:

On peut séparer les deux phases, évaporer le chloroforme et obtenir les acides gras libres qui estérifiaient la lécithine pour pouvoir les analyser.

Exercice 2:

La chromatographie de partage est une technique de séparation des molécules d'un mélange. Elle utilise une phase stationnaire (fixe) et une phase mobile. Les molécules ou solutés vont se séparer selon leur affinité pour la phase mobile ou pour la phase stationnaire. Ceux qui ont une affinité pour la phase stationnaire vont être retenus, retardés par contre ceux qui ont une affinité pour la phase mobile seront entraînés.

La trioléine est un triglycéride homogène (le même acide gras, l'acide oléique C18:1 estérifié les trois fonctions alcool du glycérol). **Elle est apolaire et non chargée.**

La phosphatidylcholine est **polaire et chargée.**

Si à **pH=7** la phosphatidylcholine **n'est pas chargée** et la **trioléine n'étant pas chargée aussi**, l'électrophorèse ne peut pas séparer ces deux molécules. Même si c'était le cas, les deux molécules étant d'une part de petite taille, d'autre part la **trioléine est insoluble dans l'eau**, l'électrophorèse est difficilement applicable car il faut **un milieu aqueux pour le champ électrique.**

Par contre, la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) **va très bien les séparer.** En effet, la phosphatidylcholine est très **polaire et insoluble dans l'éther** donc elle ne va pas migrer du tout. Elle va rester au dépôt car elle va être adsorbée par la silice (**phase stationnaire**). La trioléine étant **apolaire et soluble dans l'éther** elle va migrer avec celui-ci (**phase mobile**).

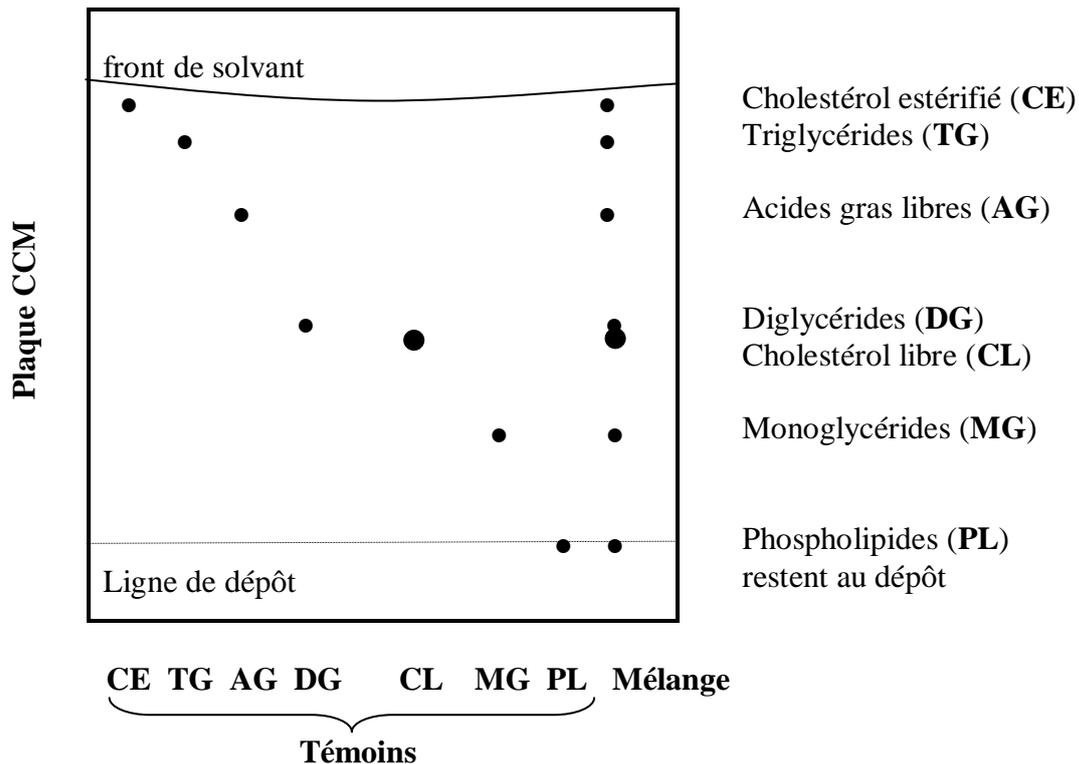
Exercice 3:

Les différents lipides vont migrer selon leur **polarité et leur solubilité dans la phase mobile**.

La polarité est l'existence dans la molécule d'au moins deux régions différentes dans l'espace.

Exemple: une chaîne hydrocarbonée, une fonction alcool, une fonction acide carboxylique, une cétone, un groupement phosphate PO_4 , un groupement azoté NH_2

Ainsi ceux qui sont polaires vont s'adsorber sur la silice qui est polaire. Les très polaires ne vont pas bouger ou peu. Ceux qui sont apolaires vont se solubiliser dans la phase mobile et migrer avec elle.



CE et TG: très apolaires: très longues chaînes hydrocarbonées masquant les oxygènes avec absence de fonctions libres

AG : légèrement apolaire: Une chaîne hydrocarbonées et une fonction $COOH$ libre

DG et CL: légèrement polaires: Longues chaînes hydrocarbonées et présence d'une seule fonction OH libre

MG : moyennement polaires: Deux chaînes hydrocarbonées et deux fonctions OH libres

PL : très polaires: Deux chaînes hydrocarbonées, un groupement phosphate (PO_4) et un groupement azoté $N^+(CH_3)_3$.

Exercice 4:

Graines oléagineuses: contiennent de l'huile (tournesol, colza, soja, arachide, coton, maïs...)

Les huiles sont constituées de presque 100% de triglycérides. Elles peuvent contenir de très faibles quantités d'autres lipides (phospholipides, stérols libres et estérifiés, acides gras libres, diglycérides, monoglycérides...).

1. Extraction des lipides totaux:

On peut extraire l'huile par **pression** des graines (en utilisant des presses appropriées). Mais, la pression ne permet pas l'extraction de la totalité des lipides. Elle laisse entre 4 à 12% dans les tourteaux (graines déshuilées).

Donc pour extraire la **totalité des lipides**, il faut d'abord **broyer** les graines pour **détruire les membranes cellulaires** et **réduire les distances** pour accélérer la diffusion de l'huile. Ensuite, il faut utiliser un solvant qui permettra l'extraction de tous les lipides (polaires et apolaires). Si on utilise l'hexane (solvant apolaire), les lipides polaires ne seront pas extraits (exemple: les phospholipides).

On utilisera donc le mélange de **Folch composé de chloroforme et de méthanol** dans les proportions **2:1**.

Ensuite, il faut filtrer pour se débarrasser des tourteaux. L'évaporation des solvants par chauffage permettra enfin de récupérer les lipides totaux.

Cette méthode peut être utilisée au laboratoire pour n'importe quel tissu animal ou végétal contenant des lipides. On peut remplacer le mélange de Folch par des solvants apparentés (éthanol-éther,...)

2. Séparation des phospholipides des triglycérides

L'extrait lipidique ainsi obtenu contient des triglycérides et des phospholipides.

Pour séparer ces deux composés, on peut utiliser deux méthodes:

- **Méthode 1:** ajouter à l'extrait lipidique 2 à 3% d'eau, mélanger vigoureusement pendant 10 à 15 minutes à froid puis centrifuger. Les phospholipides hydratables vont précipiter et se retrouver dans la phase aqueuse. Le rendement de cette séparation n'est pas toujours très élevé (on isole 50 à 80% des phospholipides)
- **Méthode 2:** Solubiliser l'extrait lipidique dans l'acétone à froid (4°C) pendant au moins 8 heures. Les phospholipides (et les sphingolipides s'ils sont présents) vont précipiter. Les triglycérides (et les autres lipides) vont rester en solution dans l'acétone. En filtrant, les phospholipides vont être retenus et les triglycérides vont se retrouver dans le filtrat.

Exercice 5:

- Fixent l'iode: **Uniquement les acides gras insaturés grâce à leurs doubles liaisons**
- sont insolubles dans l'eau: **Les deux**
- Donnent avec la soude un composé amphipatique (càd pôle hydrophobe et pôle hydrophile) soluble dans l'eau: **Les deux: formations de savons (réaction de saponification)**
- Absorbent la lumière dans l'ultraviolet: **Pas les acides gras saturés. Pas les acides gras monoinsaturés. Uniquement les acides gras polyinsaturés et qui ont en plus des doubles liaisons conjuguées**
- S'oxydent spontanément au contact de l'oxygène de l'air: **Uniquement les acides gras insaturés**

Exercice 6:

- **Relation de l'indice d'acide Ia:**

- Le dosage des acides gras libres peut se faire **directement** (KOH dans la burette, l'huile solubilisée dans l'alcool plus l'indicateur dans le becher). KOH versée va neutraliser directement les acides gras libres. La quantité de KOH contenue dans le volume versé donne directement l'indice d'acide. Avantage: méthode précise. Inconvénient: consomme trop d'alcool.
- Le dosage en retour (méthode indirecte réalisé en TP): L'acide (HCL ou H₂SO₄ de normalité Na) dans la burette. Dans l'Erlen, L'huile (masse m) est additionnée de potasse alcoolique en excès (normalité Nb) plus l'indicateur. Une certaine quantité de KOH va réagir avec les acides gras libres. L'excédent de KOH va être dosé par un volume Ve d'H₂SO₄. Il est nécessaire dans le dosage en retour d'effectuer un dosage supplémentaire (le témoin). Le volume de KOH additionnée à l'huile est dosé séparément par un volume Vt d'H₂SO₄



Vt neutralise la quantité totale de KOH utilisé

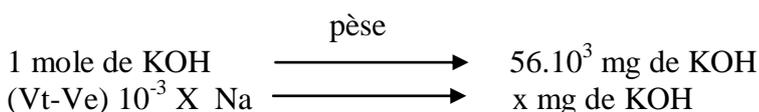
Ve neutralise la quantité de KOH excédentaire qui n'a pas réagi avec les acides gras

Vt – Ve est le volume de H₂SO₄ nécessaire pour neutraliser la quantité de KOH qui a réagi avec les acides gras libres.

(Vt – Ve) en ml est égale à (Vt-Ve) 10⁻³ litre

Puisque Va . Na = Vb . Nb

(Vt-Ve) 10⁻³ x Na = nombre de moles d'H₂SO₄ = nombre de moles de KOH qui ont réagi avec les acides gras.



$$x = 56 \cdot 10^3 \cdot (Vt-Ve) \cdot 10^{-3} \cdot Na$$

x = quantité de KOH en mg consommée par les acides gras libres contenu dans m grammes d'huile
L'indice d'acide lui correspond à 1 gramme d'huile.

Règle de trois:

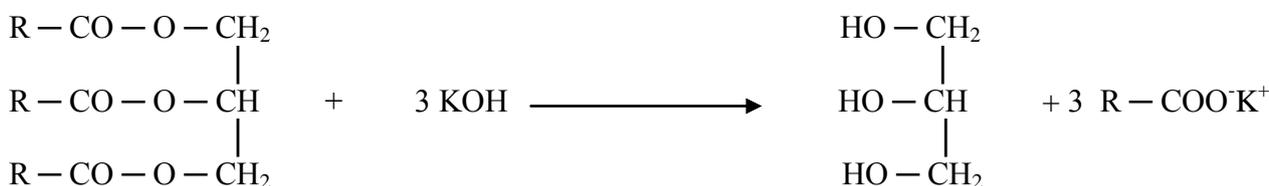
$$x = 56 \cdot 10^3 \times (V_t - V_e) \cdot 10^{-3} \times \frac{Na}{I_a} \begin{array}{l} \xrightarrow{\text{correspond à}} \\ \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \end{array} \begin{array}{l} m \text{ grammes d'huile} \\ 1 \text{ gramme d'huile} \end{array}$$

D'où la relation:

$$I_a = \frac{56 (V_t - V_e) Na}{m}$$

La même relation est obtenue pour I_s car c'est exactement le même protocole. La seule différence c'est que pour I_s on chauffe l'huile après addition de KOH. IL en résulte la libération de tous les acides gras qui estérifiaient le glycérol. On aura donc une consommation de KOH plus importante.

Exercice 7:



Triglycéride (TG)

Glycérol

Savons

1 mole de TG

3 moles de KOH

PM_{TG}

3 x 56 gramme de KOH

D'où la règle de trois:

$$3 \times 56 \cdot 10^3 \text{ mg de KOH} \begin{array}{l} \xrightarrow{\text{Correspond à}} \\ \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \end{array} \begin{array}{l} PM_{TG} \text{ en gramme} \\ 1 \text{ gramme de TG} \end{array}$$

$$\text{Donc: } I_s = \frac{3 \times 56 \cdot 10^3}{PM_{TG}} \quad I_s = 535 \quad \text{d'où } PM_{TG} = 314$$

$PM_{TG} = PM_{\text{glycérol}} + 3 \times PM_{\text{acide gras}} - 3 \times PM_{H_2O}$ (3 x $PM_{H_2O} = 54$)
(puisque on a un triglycéride homogène c'est-à-dire qui est estérifié par le même acide gras sur les trois positions du glycérol)

On enlève 3 x PM_{H_2O} car chaque liaison ester entre un acide gras et un alcool du glycérol enlève H_2O

avec $PM_{\text{glycérol}} = 92$

et $PM_{\text{acide gras}} = 12n + 2n + 32$ car formule brute d'un acide gras saturé est $C_nH_{2n}O_2$

D'où $PM_{TG} = 92 + 3 \times (14n + 36) - 54$ d'où le nombre de carbone de l'acide gras saturé est $n = 4$

L'acide gras est l'acide butyrique, le triglycéride est la tributyrine.

Exercice 8:



$$\begin{array}{ccc} 1 \text{ mole} & + & x \text{ mole de } \text{I}_2 \\ \text{PM ag} & & x \cdot \text{PM } \text{I}_2 \end{array} \qquad \text{PM } \text{I}_2 = 254$$

Ii = quantité de I₂ en gramme fixée par 100 grammes de corps gras

D'où la règle de trois:

$$\begin{array}{ccc} \text{Ii} & \longrightarrow & 100 \text{ grammes d'acides gras} \\ x \cdot 254 & \longrightarrow & \text{PM de l'acide gras} \end{array}$$

$$\text{D'où: } \text{Ii} = \frac{x \cdot 254 \cdot 100}{\text{PMag}}$$

La formule brute d'un acide gras insaturé est $\text{C}_n \text{H}_{2n-2x} \text{O}_2$ avec n = nombre de carbone et x = nombre de doubles liaisons.

$$\text{D'où: } \text{Ii} = \frac{x \cdot 254 \cdot 100}{12n + 2n - 2x + 32}$$

Application numérique : avec n = 18 et Ii = 270, on trouve le nombre de doubles liaisons x = 3
Il s'agit de l'acide linoléique C18:3

Exercice 9:

Recherche du poids moléculaire du Triglycéride:

$$\text{Is} = \frac{3 \cdot 56 \cdot 10^3}{\text{PM}_{\text{TG}}} = 196 \qquad \text{d'où } \text{PM}_{\text{TG}} = 857$$

Recherche du nombre total de double liaison dans le triglycéride:

$$\text{Ii} = \frac{x \cdot 254 \cdot 100}{\text{PM}_{\text{TG}}} = 59 \qquad \text{d'où } x = 2$$

Le triglycéride contient deux acides gras : l'acide palmitique C16:0 saturé et l'acide oléique C18:1 monoinsaturé. Puisque le triglycéride renferme deux doubles liaisons donc c'est l'acide oléique qui doublé dans le triglycéride. Il s'agit de la dioléopalmitine.