

Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne

par

G. DARNÉ et J. MADERO-TAMARGO

Adjustment of a method of extraction of total soluble lipids, total soluble carbohydrates and total soluble phenolic compounds from the organs of the vine

S u m m a r y . — It is possible to obtain very quickly from the same powdered plant material total amounts of soluble lipids, soluble carbohydrates and soluble phenolic compounds. The number of operations required depends upon the organ concerned and has been determined for the fruiting shoots, the leaves, the rachises, the berries and the seeds.

Introduction

Afin de pouvoir étudier plus facilement les acides gras, les glucides solubles totaux et les composés phénoliques solubles totaux des organes végétatifs de la vigne, nous avons été amené à mettre au point une technique d'extraction permettant d'obtenir ces trois groupes de constituants biochimiques à partir d'un même extrait. Cette technique est basée sur la solubilité des glucides et des composés phénoliques dans un mélange hydroalcoolique et sur la solubilité des lipides dans le chloroforme. Elle tient compte des méthodes utilisées respectivement par ATALAY (1975), DARNÉ (1975) et FERCHAUD (1976) pour le dosage des acides gras, des composés phénoliques solubles totaux et des glucides solubles totaux.

Principe

Le matériel végétal fixé par lyophilisation est broyé dans un solvant d'extraction constitué d'un mélange chloroforme/éthanol/eau distillée en proportions 2/1/1 en volumes.

Par centrifugation, deux phases liquides se séparent: l'une, chloroformique, contient les lipides, l'autre, hydroalcoolique, contient les glucides solubles et les composés phénoliques solubles.

Les deux phases obtenues sont ensuite soumises à une série de traitements qui permettent d'obtenir finalement trois extraits:

- un extrait «lipides solubles totaux»
- un extrait «composés phénoliques solubles totaux»
- un extrait «glucides solubles totaux»

Ces trois extraits peuvent éventuellement être conservés au moins deux ans au congélateur (-40°C) avant de procéder au dosage.

Description de la méthode

Sitôt récolté et nettoyé, le matériel végétal est grossièrement fragmenté au sécateur, de préférence dans une salle à basse température. Les fragments ainsi obtenus sont immédiatement portés dans un lyophilisateur à plateaux dont la température a été abaissée à -45°C .

Après 24 h de lyophilisation, les échantillons sont finement broyés et homogénéisés à l'aide du broyeur A. H. Thomas type «Wiley». Les dimensions des particules obtenues étant de l'ordre de 0,25 mm, les surfaces se trouvent considérablement augmentées ce qui rendra particulièrement efficace l'action des solutions d'extraction. La poudre, une fois récupérée, doit être conservée dans un flacon en plastique hermétiquement clos.

A — Obtention des phases hydroalcoolique et chloroformique

On introduit 1 g de poudre dans un tube à centrifugation de 80—100 ml.

A l'aide d'une pipette à écoulement rapide, on ajoute successivement 10 ml d'éthanol à 95° Gay Lussac, puis 10 ml d'eau distillée.

Un premier mixage est effectué pendant 2 min à l'aide d'un omni-mixer «Sorval» ou «Ultra-Turrax» tournant à 10 000 tours/min.

On ajoute ensuite 20 ml de chloroforme au contenu du tube et l'on procède alors à un deuxième mixage (5 000 à 10 000 tours/min) pendant 1 min 30 s.

Les parois du tube et l'axe de l'omni-mixer sont ensuite rincés avec un minimum d'eau distillée que l'on récupère dans le tube.

Après équilibrage, le tube et son contenu sont placés dans la centrifugeuse. La centrifugation (5000 tours/min) dure 10 min et, par précaution, est effectuée à température contrôlée (10°C). Il apparaît alors trois phases:

- la phase supérieure, colorée en brun-jaune, contient l'eau, l'éthanol et les produits hydrosolubles qui nous intéressent: glucides et composés phénoliques
- la phase inférieure, colorée en vert, renferme le chloroforme, les lipides et des pigments (chlorophylle, caroténoïdes)
- la phase intermédiaire est constituée par la poudre

A l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une petite poire pour l'aspiration, les deux phases liquides sont prélevées séparément puis introduites dans des ballons de capacités différentes (500 ml pour la phase hydroalcoolique et 100 ml pour la phase chloroformique).

La poudre qui reste dans le tube à centrifugation est soumise à de nouvelles extractions effectuées selon le même protocole jusqu'à ce qu'elle soit complètement épuisée de ses lipides solubles. Le nombre de ces extractions est fonction de la richesse en lipides du matériel végétal utilisé, donc de la nature de l'organe étudié comme nous le verrons plus loin. La dernière fraction chloroformique doit rester incolore. L'ensemble des phases chloroformiques réunies dans le ballon de 100 ml constitue la phase chloroformique totale.

A ce stade de l'extraction, la poudre végétale ne contient plus de lipides mais elle retient encore des glucides et des composés phénoliques dont il faut poursuivre l'extraction. On la soumet donc à un nouveau mixage avec 40 ml d'eau/éthanol (1/1) pendant 2 min à 10 000 tours/min pour récupérer le surnageant qui sera ajouté aux autres fractions hydroalcooliques.

Cette opération broyage-centrifugation est poursuivie dans les mêmes conditions jusqu'à épuisement de la poudre en ses composés hydrosolubles. L'ensemble des phases hydroalcooliques réunies dans le ballon de 500 ml constitue la phase hydroalcoolique totale. Là encore, le nombre d'extractions dépend de la nature de l'organe végétatif étudié.

B — Obtention de l'extrait «composés phénoliques solubles totaux»

L'alcool de la phase hydroalcoolique totale est évaporé sous vide partiel à 30 °C maximum au moyen d'un évaporateur rotatif. L'évaporation est arrêtée lorsque le volume de cette phase ne représente plus que le 1/5ème environ de son volume initial.

L'extrait aqueux ainsi obtenu est filtré sur filtre Whatman G. F. A. préalablement humidifié de façon à éliminer les particules de poudre en suspension. Après rinçage du filtre et de l'entonnoir avec de l'eau distillée, le volume de l'extrait est ajusté à 200 ml puis divisé en deux fractions égales.

La première fraction de 100 ml, que l'on peut éventuellement conserver au congélateur dans un flacon en plastique hermétiquement bouché, constitue l'extrait aqueux «composés phénoliques solubles totaux». La seconde fraction est conservée pour préparer un extrait alcoolique de glucides.

C — Obtention de l'extrait «glucides solubles totaux»

La fraction de 100 ml de l'extrait aqueux réservée pour le dosage des glucides solubles totaux est soumise à une évaporation sous vide partiel de façon à être ramenée à un volume d'environ 5 ml. L'extrait est alors transvasé dans un pilulier de 40 ml dans lequel on récupère la solution aqueuse à 10 % de n-propanol utilisée pour rincer le ballon d'évaporation. (On procède à 5 rinçages avec chaque fois 3 ml de solution.)

L'évaporation est achevée sous un courant d'azote afin d'éviter la dégradation des glucides. Le résidu sec est immédiatement repris, par agitation, avec 10 ml exactement mesurés de n-propanol à 10 %. On obtient ainsi l'extrait «glucides solubles totaux». Il peut être conservé au congélateur dans le pilulier hermétiquement bouché avant d'être utilisé pour l'analyse.

D — Obtention de l'extrait «lipides solubles totaux»

La phase chloroformique totale est évaporée sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif et à une température maximale de 30 °C. Lorsque son volume est réduit à 2 ou 3 ml, elle est transvasée dans un pilulier de 40 ml dans lequel on récupère le chloroforme utilisé pour rincer le ballon (on fait 5 rinçages avec chaque fois 5 ml de chloroforme).

L'évaporation du chloroforme est reprise dans le pilulier jusqu'à ce que la phase soit réduite à un volume de 1 ml environ. Puis afin d'éviter l'oxydation des lipides, l'évaporation est poursuivie sous un courant d'azote jusqu'à l'obtention d'un extrait sec. Ce dernier doit être immédiatement repris par agitation en présence de 10 ml exactement mesurés d'un mélange benzène/éthanol (4/1 en volumes). Il représente l'extrait «lipides solubles totaux» contenant les acides gras et peut être conservé au congélateur dans le pilulier hermétiquement bouché avant d'être utilisé pour l'analyse.

Application aux différents organes de la vigne

La méthode que nous venons de décrire a été appliquée aux rameaux principaux, aux feuilles, aux rafles, aux baies et aux pépins. Nous avons donc déterminé, pour chacun de ces organes, le nombre d'extractions nécessaires pour obtenir la totalité des lipides, des glucides et des composés phénoliques solubles. Nous avons ensuite vérifié la reproductibilité de la méthode.

A — Nombre d'extractions nécessaires pour chaque organe

Les prélèvements d'organes (Cabernet Sauvignon/SO₄) ont été effectués le même jour, à l'époque de la maturité des raisins, en choisissant uniquement des grappes de rang 1, les feuilles opposées à ces grappes et les mérithalles immédiatement sous-jacents.

Toutes les extractions ont porté sur 1 g de poudre et une analyse des phases chloroformiques et hydroalcooliques a été faite après chaque extraction.

Tableau 1

Pourcentages d'acides gras contenus dans les extraits chloroformiques successifs de 1 g de poudre de feuilles

Percentages of fatty acids in the successive chloroformic extracts from 1 g of powdered leaves

N° des extraits	C _{16:0}	C _{18:0}	A.G.S.	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	A.G.I.	A.G.T.
1	68,3	59,3	66,9	63,6	70,6	82,1	77,3	73,3
2	16,6	19,8	17,1	19,8	17,0	13,9	15,3	16,0
3	7,5	11,8	8,2	10,2	7,8	4,0	5,6	6,6
4	3,7	9,1	4,6	6,3	4,6	0	1,8	2,8
5	2,1	0	1,7	0	0	0	0	0,7
6	1,8	0	1,5	0	0	0	0	0,6

C_{16:0}: acide palmitique.

C_{18:0}: acide stéarique.

C_{18:1}: acide oléique.

C_{18:2}: acide linoléique.

C_{18:3}: acide linoléique.

A.G.S.: acides gras saturés.

A.G.I.: acides gras insaturés.

A.G.T.: acides gras totaux.

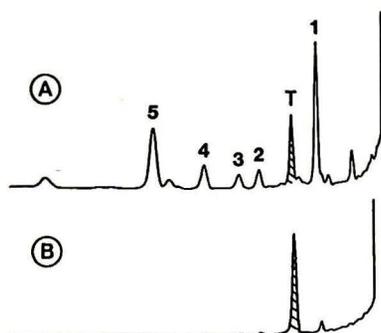
a) Cas des lipides soluble totaux

La présence de lipides a été décelée par chromatographie en phase gazeuse en dosant les acides gras libérés par saponification.

La saponification des lipides et la méthylation de leurs acides gras ont été réalisées selon la méthode de METCALFE *et al.* (1966), après avoir vérifié l'absence de glucides et de composés phénoliques dans les phases chloroformiques.

D'après les résultats que nous avons obtenus, on peut considérer qu'il faut procéder à 5 extractions par le chloroforme pour délipider 1 g de poudre de mérithalles, de feuilles, de rafles et de baies prélevées au stade de la maturité des raisins (Fig. A et B). Sur le Tableau 1, relatif aux feuilles, on con-

state en effet que près de 75 % des acides gras totaux sont extraits dès le premier mixage en présence de chloroforme et que plus de 99 % le sont après 5 extractions. Par contre, pour les pépins, il est nécessaire de procéder à 8 extractions successives, mais si l'on utilise seulement 0,5 g de poudre et non 1 g, la délipidation est complète au bout de 5 extractions.



Acides gras des feuilles: A — Après la 1ère extraction. B — Après la 5ème extraction. — 1 : acide palmitique, 2 : acide stéarique, 3 : acide oléique, 4 : acide linoléique, 5 : acide linoléique. T : acide margarique.

Fatty acids of leaves: A — After the 1st extraction. B — After the 5th extraction. — 1: palmitic acid, 2: stearic acid, 3: oleic acid, 4: linoleic acid, 5: linolenic acid, T: margaric acid.

b) Cas des glucides solubles totaux

La mise en évidence des glucides a été faite par la réaction de Fehling et vérifiée par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode décrite par FERCHAUD (1976).

Les résultats obtenus à partir des différentes poudres montrent que la majeure partie des glucides solubles totaux est libérée au cours des 3 premières extractions hydroalcooliques. Mais il faut au total au moins 4 extractions pour épuiser totalement la poudre des méristhalles et des pépins et davantage encore pour épuiser celle des autres organes: au moins 5 dans le cas des feuilles (Tableau 2) et 6 pour les baies et les rafles.

Tableau 2

Pourcentages de glucides solubles contenus dans les extraits hydroalcooliques successifs de 1 g de poudre de feuilles

Percentages of soluble carbohydrates in the successive hydroalcoholic extracts from 1 g of powdered leaves

Nº des extraits	Fructose	Glucose	Saccharose	G.S.T.
1	82,0	63,4	65,9	69,9
2	14,6	25,8	34,1	22,5
3	3,4	4,3	0	3,5
4	0	3,8	0	2,0
5	0	2,7	0	1,5

G.S.T.: glucides solubles totaux.

c) Cas des composés phénoliques solubles totaux

La présence des composés phénoliques solubles totaux a été détectée par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode de RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1966).

Tableau 3

Pourcentages des composés phénoliques solubles contenus dans les extraits hydroalcooliques successifs de 1 g de poudre des différents organes

Percentages of soluble phenolic compounds in the successive hydroalcoholic extracts from 1 g of the different powdered organs of the vine

N° des extraits	Mérithalles	Feuilles	Rafles	Baies	Pépins
1	62,1	70,0	65,6	65,5	71,2
2	19,3	18,9	20,7	12,6	14,7
3	8,3	5,7	6,7	5,5	5,8
4	4,8	2,7	3,6	5,2	3,0
5	3,1	1,5	1,8	4,8	2,8
6	2,4	1,2	1,5	4,7	2,0
7	0	0	0,1	1,7	0,5

Tableau 4

Pourcentages de tanins solubles contenus dans les extraits hydroalcooliques successifs de 1 g de poudre de mérithalles

Percentages of soluble tannins in the successive hydroalcoholic extracts from 1 g of powdered fruiting shoots

N° des extraits	Tanins solubles
1	76,4
2	21,8
3	1,8
4	0

Les résultats présentés dans le Tableau 3 montrent que la majeure partie de ces composés (60 à 70 %) est libérée au cours de la première extraction hydroalcoolique et que 99 % sont passés en solution après 6 extractions quel que soit l'organe analysé. Il faut noter cependant que des traces de composés phénoliques solubles subsistent encore dans le 7ème extrait hydroalcoolique des baies, des rafles et des pépins qui sont les organes les plus riches en ces substances.

Le dosage de la fraction de ces composés phénoliques solubles totaux correspondant aux tanins facilement extractibles (flavanediols 3—4) a également été réalisé sur les extraits successifs des différents organes en utilisant la réaction de BATE-SMITH, selon la méthode de RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1966). Il est nécessaire d'effectuer 6 extractions hydroalcooliques si l'on veut récupérer la totalité de ces tanins dans les rafles, les baies et les pé-

pins, bien que 90 % de ces composés soient déjà obtenus après la 3^{ème} extraction. Dans le cas des méritalles (Tableau 4), la totalité de ces composés est libérée dès la 3^{ème} extraction hydroalcoolique.

B — Reproductibilité de la méthode

Pour vérifier la reproductibilité de la méthode qui vient d'être décrite, nous avons procédé à plusieurs séries d'extractions sur différents échantillons. Dans le cas des méritalles par exemple, nous avons réalisé 3 séries d'extractions simultanées sur 3 échantillons de 1 g d'une même poudre.

L'un des échantillons (n° 1) a été étudié aussitôt après le prélèvement. Les deux autres (n° 2 et 3) ont été conservés pendant un an et les séries d'extraction ont été faites en même temps sur chacun d'eux, mais par un opérateur différent. Les résultats obtenus pour les trois catégories de substances étudiées: acides gras, glucides solubles totaux et composés phénoliques totaux (Tableau 5) peuvent être considérés comme identiques. Ils montrent en outre que la composition chimique de la poudre lyophilisée n'a subi aucun changement significatif au bout d'un an de conservation.

Tableau 5

Résultats des analyses effectuées sur 3 extraits différents de la même poudre végétale et exprimés en $\mu\text{g/g}$ pour les acides gras, en mg/g pour les glucides et les tanins, et par l'indice de Folin Ciocalteu pour les composés phénoliques totaux. L'extrait n° 1 a été préparé le 10-X-77 et analysé le 14-X-77, les extraits n° 2 et 3 ont été préparés le 13-XI-78 et analysés le 16-XI-78

Results of analysis of 3 different extracts from the same plant powder, expressed in $\mu\text{g/g}$ for the fatty acids, in mg/g for the carbohydrates and the tannins and by the Folin Ciocalteu index for the total phenolic compounds. The extract no. 1 was prepared on October 10, 1977, and analyzed on October 14, 1977, the extracts nos. 2 and 3 were prepared on November 13, 1978, and analyzed on November 16, 1978

	N° 1	N° 2	N° 3
A.G.T	3244,1	3258,1	3245,3
A.G.S.	1040,8	1055,4	1045,4
A.G.I.	2203,3	2202,7	2199,9
C. 6:0	925,6	911,1	906,6
C18:0	115,2	144,3	138,8
C18:1	415,5	418,2	429,4
C18:2	1449,7	1459,8	1463,1
C18:3	336,1	324,7	327,4
G.S.T.	19,5	19,9	20,0
Fructose	3,9	3,6	3,6
Glucose	5,9	5,9	5,9
Saccharose	9,7	10,4	10,5
I.F.C.	22,9	22,4	21,9
Tanins	26,5	26,5	26,5

I.F.C.: indice de Folin Ciocalteu.

Autres abréviations voir Tableaux 1 et 2.

Ainsi, l'extraction simultanée de la totalité des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux est possible. La méthode préconisée est simple, rapide et parfaitement reproductible. Le nombre d'opérations à réaliser dépend de la nature de l'organe et sans doute aussi de l'époque de prélèvement. Il nous reste à mettre au point maintenant la technique permettant de récupérer, à partir du culot de centrifugation, l'amidon et les composés phénoliques fortement polymérisés qu'il serait intéressant de pouvoir étudier aussi.

Résumé

Il est possible d'obtenir très rapidement et à partir d'une même poudre la totalité des lipides solubles, des glucides solubles et des composés phénoliques solubles. Le nombre d'opération nécessaires dépend des organes et a été déterminé pour les rameaux principaux, les feuilles, les rafles, les baies et les pépins.

Références bibliographiques

- ATALAY, D., 1975: Recherches sur l'évolution des principaux acides gras des sarments de vigne au cours du cycle végétatif et des boutures au cours de la rhizogenèse. Thèse 3ème Cycle, Bordeaux.
- DARNÉ, G., 1975: Recherches sur l'évolution des composés phénoliques totaux et des leucoanthocyanes des sarments de vigne au cours du cycle végétatif et des boutures au cours de la rhizogenèse. Thèse 3ème Cycle, Bordeaux.
- FERCHAUD, J., 1976: Recherches sur les variations de quelques constituants biochimiques (eau, glucides solubles, composés phénoliques et acides gras) des grappes et des sarments de vigne au cours de la floraison et de la véraison. Thèse 3ème Cycle, Bordeaux.
- METCALFE, L. D., SCHMITZ, A. A. and PELKA, S. R., 1966: Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analyt. Chem.* 38, 514—515.
- RIBÉREAU-GAYON, P. et STONESTREET, E., 1966: Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Analyt.* 48, 188—196.

Eingegangen am 7. 5. 1979

G. DARNÉ
J. MADERO-TAMARGO
Laboratoire de Physiologie Végétale
et Ampélogie
Université de Bordeaux I
Avenue des Facultés
33405 Talence cedex
France