

CARACTÉRISATION DE L'HUILE DES GRAINES DE L'ORANGE MALTAISE (*CITRUS SINENSIS*) POUSSANT EN TUNISIE

Ines El Mannoubi *, Thouraya Skanji *, Sami Barrek, Hédi Zarrouk

Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique, Technopole de Sidi Thabet, 2020 Tunisie
Unité de Recherche « Etudes physico-chimiques des substances et milieux naturels » UR01INRAP05

(Reçu le 27 Février 2009, accepté le 6 Mars 2010)

RESUME : La composition de l'huile des pépins de l'orange maltaise tunisienne (*Citrus sinensis*) a été déterminée en terme de triacylglycérols (TAG); acides gras et stérols. Les graines contiennent 17.3% de matière grasse. Les principaux TAG sont SLL (21.22%), PLL (16.21%), POL (12.80%), SOL+POO (10.97%) et OLL (10.57%). L'acide linoléique (38.81%) est l'acide gras majeur suivi des acides palmitique (26.42%) et oléique (24.63%). Les graines contiennent 477.1 mg/100 g de stérols totaux avec la prédominance du β -sitostérol qui représente 74.95% de la teneur en stérols de l'huile. La teneur en tocophérols est de 73.42 mg/Kg avec la prédominance de l'alpha tocophérol (98.8 % des tocophérols totaux).

Mots-clés : *citrus sinensis*, lipides; triglycérides, acides gras, stérols, tocophérols

ABSTRACT: Triacylglycerol, fatty acid and sterol composition of fixed oil obtained from of *Citrus sinensis* seeds from Tunisia have been investigated. The seeds contained 17.3% fixed oil. The main TAGs were SLL (21.22%), PLL (16.21%), POL (12.80%), SOL+POO (10.97%) et OLL (10.57%). Linoleic acid (38.81%) was the dominating fatty acid followed by palmitic (26.42%) and oleic (24.63%) acids. the seeds contain 477.1 mg/100 g of total sterols with the predominance of β -sitosterol which accounted for 74.95% of the total sterol content in seed oil. The tocopherols content is 73,42 mg/Kg with the predominance of alpha tocopherol (98.8 % of total tocopherols).

Key words: *Citrus sinensis*, lipides, triglycerides, fatty acids, sterols, tocopherols

INTRODUCTION

Les graines oléagineuses sont des sources importantes d'huiles d'importance alimentaire, industrielle et pharmaceutique [1]. Les huiles et les graisses constituent une des trois classes principales du produit alimentaire, en plus des protéines et des glucides [2]. Les huiles végétales se composent principalement de TAG et d'un mélange complexe de composés mineurs (2-5%) avec une diversité de structures chimiques [3]. La fraction non-glycéridique ou insaponifiable est formée de différentes classes de composés telles que des hydrocarbures, des tocophérols, des stérols et des esters de stérol. Les stérols végétaux, appelés également phytostérols présentent la plus grande proportion de la fraction insaponifiable des lipides [3,4]. Les phytostérols et leurs dérivés sont largement utilisés dans différents secteurs industriels (pharmaceutique, agro-alimentaire et cosmétique) en raison leurs activités biologiques spécifiques et de leurs propriétés physiques et chimiques [5]. Les stérols sont employés pour réduire le risque athérosclérotique [6,7] et pour le traitement de l'hypercholestérolémie [7-9]. En outre, ils peuvent avoir effets bénéfiques contre le cancer du colon [7].

Les tocophérols et les tocotriénols, généralement connus sous le nom de vitamine E, sont les principaux antioxydants naturels présents dans les huiles des graines oléagineuses [10,11]. Le déficit en vitamine E chez l'homme cause des défauts dans le développement du système nerveux chez les enfants et l'hémolyse chez l'homme. La vitamine E peut diminuer le risque

* correspondants, e-mails : thouraya.skanji@inrap.rnrt.tn, ines_mannoubi@yahoo.fr

athérosclérotique, le cancer et les crises cardiaques [10,12]. L' α -tocophérol est employé dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques. La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols. Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI) [13]. Les agrumes (famille Rutacées) sont parmi les fruits les plus largement produits partout dans le monde et sont d'une importance économique considérable [14]. Les graines et les écorces constituent les matières de rebut. Les écorces ont été sujettes aux plusieurs travaux de recherche prouvant leur richesse en huile essentielle et flavonoïdes [15] alors que les graines sont très peu étudiées [16].

Le but de ce travail est de valoriser les graines de l'orange maltaise (*Citrus sinensis*) d'origine tunisienne et de prouver son potentiel lipidique en termes de triglycérides, d'acides gras, de stérols et de tocophérols.

MATERIEL ET METHODES

Les fruits d'orange maltaise ont été achetés d'un marché local à Tunis. Ils ont été lavés puis épluchés. Les graines ont été isolées du reste de la plante par pression. Elles sont ensuite lavées à l'eau et séchées à température ambiante.

1- Extraction de l'huile

L'extraction de la matière grasse a été réalisée à l'hexane dans un système d'extraction de type soxhlet pendant 9 heures sur une masse de 15 g de graines de l'orange maltaise préalablement broyées. A la fin de l'extraction, le solvant est évaporé dans un évaporateur rotatif sous vide, en chauffant légèrement (+ 40°C). Les traces résiduelles d'eau ont été éliminées en utilisant une substance déshydratante (sulfate de sodium anhydre).

2- détermination des indices de l'huile

L'indice d'acide, de peroxyde, de saponification et d'iode sont déterminés selon les normes internationales ISO 660, ISO 3960, ISO 3657 et ISO 3961 respectivement.

3- Analyse des triglycérides de l'huile des graines par CLHP

Les triacylglycérols (TAG) ont été analysés selon la méthode AOAC n° 993.24 [17] par chromatographie liquide à haute performance à polarité des phases inversées sur un chromatographe Agilent HP1100 équipé d'un détecteur à indice de réfraction (RID), d'une pompe isocratique, d'un injecteur automatique et d'un four thermostaté. La séparation des triglycérides a été réalisée sur une colonne de type C₁₈ Hypersil ODS (granulométrie 5 μ m) de 12,5 cm de longueur et de 4 mm de diamètre intérieur. La phase mobile est composée d'un mélange acétone/acétonitrile (65/35) maintenue à un débit de 0,5 mL/min. L'élution des triglycérides se produit selon le nombre équivalent de carbone NEC où NEC = NC (nombre de carbone)-2ND (nombre de double liaison). Les aires des pics sont utilisées pour quantifier les composés en se basant sur leurs pourcentages relatifs. Les huiles de maïs, tournesol, soja ont été utilisés comme des huiles de référence. La présence de la trioléine (OOO) a été déterminée en employant une solution étalon de trioléate dans les mêmes conditions d'analyse.

4- Analyse des acides gras par CPG et GC-SMHR

La transestérification de l'huile a été effectuée en présence d'une solution de potasse méthanolique 2N. Les esters méthyliques d'acides gras ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur un chromatographe Agilent équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire polaire INNOWAX (polyéthylène glycol, 30m \times 0.25mm d.i, épaisseur de film 0,25 μ m). Le gaz vecteur étant l'hélium avec un débit de 1 mL/min. la température de l'injecteur est de 270°C. La programmation de la température du four consiste en une élévation de 75°C à 240°C à 5°/min puis une rampe de 20 min à 240°C. L'identification des E.M.A.G a été réalisée par coulage du même chromatographe à un spectromètre de masse Autospec M 610 (Waters). Les spectres de masse ont été réalisés par impact électronique à 70 eV, la température de la source d'ionisation est maintenue à 250°C et l'analyseur de masse est de type EBE.

L'acquisition des spectres a été réalisée entre 50 et 800 Da. Les spectres de masse obtenus sont comparés à ceux de la bibliothèque NIST 2002.

5- Détermination de la teneur en stérols individuels et totaux

Les stérols ont été analysés selon la méthode ISO 12228 [18]. Après saponification d'une prise d'essai de 250 mg par une solution éthanolique de potassium à ébullition sous reflux. La fraction insaponifiable est isolée par extraction en phase solide sur une colonne d'oxyde d'aluminium (Scharlau). La fraction stérolique est séparée de l'insaponifiable par chromatographie sur couche mince sur une plaque de silice Kielsegel 60 F254 Merck (20 × 20, e=0.25mm), l'éluant étant un mélange hexane/éther (50/50, v/v). Les stérols ont été silylés par 100 µl de réactif silylant (50µl de 1-méthyle imidazole dans 1mL de N-méthyle-N-(triméthylsilyl-heptafluorobutyramide) (Fluka) pendant 15 min à 105°C. puis analysés (après silylation) par CPG sur un chromatographe Agilent équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire HP5 de longueur 30 m, de diamètre interne 0,32 mm, et de 0,25 µm d'épaisseur du film. La température de l'injecteur est de 270°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 240 à 255°C, à 4°C/min, puis en un palier de 65 min à 255°C. L'injection se fait en mode avec division avec un rapport de 1/10. Le gaz vecteur est l'hélium à 1 mL/min. Les stérols ont été identifiés selon leurs temps de rétention relatifs par rapport à la bétuline et en utilisant des substances étalons (cholestérol, campestérol, stigmastérol et β-sitostérol). Les résultats sont approuvés par CPG-SMHR.

6- Analyse des tocophérols et tocotriénols par CLHP

La détermination des teneurs en tocophérols et tocotriénols a été effectuée selon la norme internationale ISO 9936 [19] par chromatographie liquide à haute performance en phase normale. Le système chromatographique utilisé est une chaîne HP1100 composée d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur à fluorescence dont la longueur d'onde d'excitation est réglée sur 290 nm et la longueur d'onde d'émission sur 330 nm.

La colonne utilisée est Pinnacle II Silica de longueur 150 mm et de diamètre intérieur 3,2mm remplie de microparticules de silice de diamètre moyen 3µm. La phase mobile utilisée est un mélange hexane/isopropanol (99,5:0,5, v/v) avec un débit de 0,5 mL/min. Afin d'identifier les tocophérols, une solution de standards (α, β, δ, et γ tocophérols) (Roche) est analysée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon.

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Propriétés chimiques

Les graines montrent un bon rendement en huile. Le tableau I donne les valeurs de quelques indices classiques.

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile des graines

Rendement	17,3%
Indice d'acide	2,74
Indice de peroxyde (meq O ₂ /kg d'huile)	1,0
Indice de saponification (mg KOH/g d'huile)	185,95
Indice d'iode(g I ₂ /100 g d'huile)	100,1

Les valeurs des indices d'iode et de saponification montrent que cette huile contient surtout des acides gras insaturés à longueur de chaîne moyenne. L'indice de peroxyde montre que l'huile est relativement stable à l'oxydation. La valeur élevée de l'indice d'iode et la stabilité oxydative prouvent que les graines présentent les bonnes qualités d'une huile comestible.

2- Composition en TAG et en acides gras

L'analyse des triglycérides réalisée par HPLC sur colonne à polarité des phases inversées a permis de mettre en évidence la présence de 14 TAG de compositions différentes (Tableau II). Cette huile est riche en TAG essentiellement en SLL; PLL et POL. On note la présence des TAG SOL+POO et OLL en quantité quasi-égale.

Tableau II : Composition glycéridique de l'huile des pépins d'orange malthaise

TAG	ECN	%
LLLn	40	1,64
OLnLn	40	0,13
LLL	42	5,85
OLLn	42	3,03
OLL	44	10,57
PLL	44	16,21
POLn	44	1,25
OOL	46	5,91
SLL	46	21,22
POL	46	12,80
OOO	48	2,24
SOL+POO	48	10,97
PPO	48	8,20

Tableau III : Composition en acides gras de l'huile des pépins d'orange malthaise

Acide gras	pourcentage
C16:0	26,42
C16:1	0,37
C17:0	0,13
C18:0	4,44
C18:1	24,63
C18:2	38,81
C18:3	3,47
C20:0	0,22
C22:0	0,56
C22:1	0,73
C24:0	0,22
AGS	31,99
AGMI	25,73
AGPI	42,28

Le tableau III donne les résultats de l'analyse par CPG des esters méthyliques d'acides gras (EMAG). L'huile de pépins de l'orange malthaise est de type linoléique étant donné que son AG majeur est l'acide linoléique. Par ailleurs, on note la prédominance, au niveau du profil lipidique des pépins d'orange des AGPI dont le taux exprimé en % des AGT est de 42,28%. Ils sont représentés majoritairement par l'acide linoléique suivi de l'acide linoléique. Les AGPI sont suivis par les AGS faisant 31,99% des AGT et qui sont représentés essentiellement par l'acide palmitique. La classe la moins représentée est celle des AGMI. Par ailleurs, il est à noter que l'huile de pépins de l'orange malthaise est fortement insaturée (68,01%). Son taux d'insaturation défini par le rapport AGI/AGS est de 2,12%. En outre, les acides arachidique et béhénique ont été détectés en faible proportion.

3- Composition des stérols

L'analyse quantitative de la fraction stérolique montre que l'huile contient une teneur élevée en stérols (477,1 mg/100 g). β -Sitostérol, campestérol et stigmastérol, sont les composés majeurs parmi les 7 stérols identifiés. Le β -sitostérol et le campestérol sont les deux stérols qui constituent ensemble 88,75% de la totalité des stérols. Le β -sitostérol est le stérol marqueur puisqu'il présente 74,95%. De plus, le stigmastérol et le brassicastérol sont présents à 3,75% et 1,55% respectivement. De petites quantités de Δ 5-avenasterol, Δ 7-avenasterol et sitostanol sont aussi détectées. Les résultats sont donnés dans le tableau IV.

4- Composition des tocophérols.

L'analyse chromatographique des tocophérols par chromatographie liquide à haute performance en présence des quatre tocophérols (α , β , γ et δ) comme standards nous a permis de confirmer la présence de tous les isomères. L'alpha tocophérol est le composé majoritaire à une teneur égale à 72.54 mg/Kg et présente à lui seul 98.8 % des tocophérols totaux, le gamma tocophérol présente 0.82 mg/kg de l'huile, le béta et le delta tocophérols sont détectés avec des teneurs très faibles.

Tableau IV : Teneurs en stérols de l'huile des pépins d'orange malthaise

Stérol	Concentration (mg/100g)	Fragments m/z
Cholestérol	11,74	458, 443, 368, 353, 329, 275, 255, 247, 231, 213, 129 (100)
Brassicastérol	7,39	470, 455, 380, 365, 357, 341, 282, 267, 255, 213, 129 (100)
Campestérol	65,84	472, 457, 382, 367, 343, 315, 261, 255, 227, 213, 129 (100)
Stigmastérol	17,88	484, 469, 394, 379, 355, 343, 255, 213, 159, 129, 83 (100)
β -Sitostérol	357,56	486, 471, 396, 381, 357, 329, 275, 255, 229, 213, 129 (100)
Sitostanol	6,08	488, 473, 431, 398, 383, 359, 305, 290, 230, 215, 75 (100)
Δ 5-avenastérol	3,17	484, 469, 394, 379, 355, 386, 371, 281, 257, 255, 253, 213, 211, 129, 73, 55 (100)
Δ 7-stigmastérol	4,17	486 (100), 471, 396, 381, 357, 345, 255, 229, 213, 75
Δ 7-avenastérol	3,26	469, 379, 386, 371, 343 (100), 296, 281, 253, 213

CONCLUSION

L'huile des graines de *Citrus sinensis* est composée majoritairement des triglycérides SLL, PLL, et POL qui forment plus que 50% de la totalité des triglycérides. Les acides gras dominants sont les acides linoléique, palmitique et oléique. En effet, cette huile est riche en C18:1 dont les vertus diététiques sont bien établies et qui intervient dans la prévention des maladies cardiovasculaires et l'hypercholestérolémie. Par ailleurs, elle est riche en C18:2 qui est un acide gras essentiel (AGE) jouant le rôle de précurseur pour la synthèse de plusieurs biomolécules. Les teneurs en tocophérols en stérols et en les acides gras polyinsaturés confèrent à ces graines de très bonnes qualités permettant des applications cosmétiques.

REFERENCES

- [1] M. F. Ramadan, J-T. Mörsel. Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds, *Food Chemistry*, **2003**, *80*, 197–204
- [2] R. Aparicio, R Aparicio-Ruiz, Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, **2000**, *881*, 93–104
- [3] B. Cañabate-Díaz, A. Segura Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, J. Duran Martos. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS, *Food Chemistry*, **2007**, *102*, 593–598.
- [4] S. Azadmard-Damirchi, P. C. Dutta, Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils, *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1108*, 183-187.
- [5] W. L. Xu, Y. B. Huang, J. H. Qian, O. Sha, Y. Q. Wang, Separation and purification of stigmasterol and β -sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method, *Separation and Purification Technology*, **2005**, *41*, 173–178.
- [6] M. D. Patel, P. D. Thompson, Review Phytosterols and vascular disease, *Atherosclerosis*, **2006**, *186*, 12–19.
- [7] V. Piironen, J. Toivo, and A.-M. Lampi, STUDY REVIEW: Natural Sources of Dietary Plant Sterols, *Journal of Food Composition and Analysis*, **2000**, *13*, 619-624.
- [8] Christopher P.F. Marinangeli, Krista A. Varady, Peter J.H. Jones, REVIEWS: CURRENT TOPICS: Plant sterols combined with exercise for the treatment of hypercholesterolemia: overview of independent and synergistic mechanisms of action, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2006**, *17*, 217–224.
- [9] S.L. Abidi, Capillary electrochromatography of sterols and related sterol esters derived from vegetable oils, *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1059*, 199–208.

- [10] H. Kallio, B. Yang, P. Peippo, R. Tahvonen, R. Pan, Triacylglycerols, Glycerophospholipids, Tocopherols, and Tocotrienols in Berries and Seeds of Two Subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*), *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 3004-3009.
- [11] T. Nagao, T. Kobayashi, Y. Hirota, M. Kitano, N. Kishimoto, T. Fujita, Y. Watanabe, Y. Shimada, Improvement of a process for purification of tocopherols and sterols from soybean oil deodorizer distillate, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2005**, *37*, 56-62.
- [12] M. Khaliq Ahmed, J. K. Daun, R. Przybylski, FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils, *Journal of Food Composition and Analysis*, **2005**, *18*, 359-364.
- [13] K. Sebei, S. Boukhchina, H. Kallel, Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps (*Brassica napus* L.), *C. R. Biologies*, **2007**, *330*, 55-61.
- [14] M-L. Lota, D. de Rocca Serra, F. Tomi, J-M. Bessiere, J. Casanova, Chemical composition of peel and leaf essential oils of *Citrus medica* L. and *C. limonimeditica* Lush., *Flavour Fragr. J.*, **1999**, *14*, 161-166.
- [15] A-L. Gancel, P. Ollitrault, Y. Froelicher, F. Tomi, CA. Jacquemond, F. Luro, J-M. Brillouet, Leaf Volatile Compounds of Six Citrus Somatic Allotetraploid Hybrids Originating from Various Combinations of Lime, Lemon, Citron, Sweet Orange, and Grapefruit, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 2224-2230
- [16] M. Saïdani, W. Dhifi, B. Marzouk, Lipid evaluation of some Tunisian *Citrus* seeds, *J. Food Lipids.*, **2004**, *11*, 242-250.
- [17] Norme AOAC official method 993.24, *Analyse des triglycérides de l'huile des graines par CLHP*.
- [18] Norme ISO 12228, *Fractionnement de l'insaponifiable : Détermination de la teneur en stérols individuels et totaux*.
- [19] Norme internationale ISO 9936 (1997), *Analyse des tocophérols par CLHP : détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols dans les corps gras d'origine animale et végétale*.