

RAPPORT DE STAGE

CHIMIE

Michel JACQUOT

Section Phytogénétique

Decembre 1957

MANIPULATIONS

POLARIMÉTRIE

lumière utilisée : raie D du sodium.

Avant d'interposer la solution donnée dans le trajet de la lumière, mettre soi-même l'appareil au zéro.

Applications :

- | | | | |
|----------------------|---|-----------------------------------|--------------------------|
| Solutions préparés : | 1 | { glucose 0,5%
saccharose 0,5% | avant et après hydrolyse |
| | 2 | glucose 1% | |
| | 3 | saccharose 1% | avant et après hydrolyse |

Solutions de pétale de fleurs de lupin après décoction.

A pétale rose violet sur fond blanc

B pétale jaune.

avant et après hydrolyse.

Les mesures sur A et B donnent chaque fois un angle de déviation voisin de zéro. La présence de sucres dextrogyres et lévogyres est par ailleurs confirmée par la chromatographie = chromatographie.

Les résultats de mesures sur les solutions 1, 2, 3 sont donnés dans un tableau ci-après avec les résultats obtenus par la méthode de Bertrand.

METHODE DE BERTRAND

POUR LE DOSAGE DES GLUCIDES

Méthode fidèle et rapide

Applications : les mêmes que pour la polarimétrie.

Résultats obtenus sur les solutions 1, 2, 3, A et B par la polarimétrie et la méthode de Bertrand :

(Résultats en g/l)

	Polarimétrie	Méthode de Bertrand	
		sucres réducteurs	sucres hydrolysables
1	10	5,085 (glucose)	5,085 (sac.)
2	10 (glucose)	10,035 (glucose)	0 (saccharose)
3	10,15 (sacch.)	0 (glucose)	
A		2,56	0,335
B		1,185	0,224

- NB
- 1 { glucose 0,5%
 - 2 { saccharose 0,5%
 - 3 { glucose 1%
 - saccharose 1%
 - A lupin robe violet sur fond blanc
 - B lupin jaune

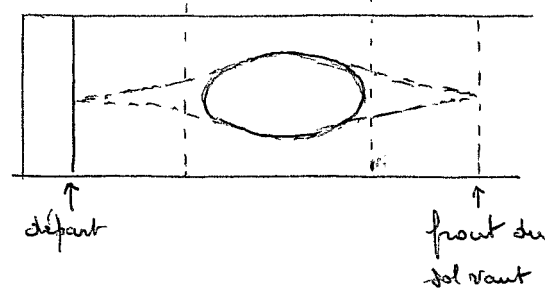
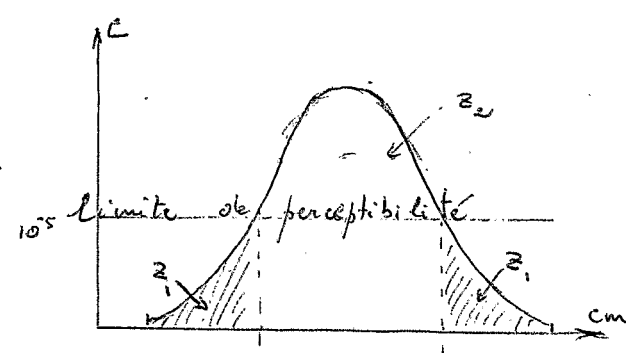
CHROMATOGRAPHIE

sur papier

On utilise le phénomène de migration différentielle, avec une phase stationnaire (eau), dont la feuille de papier est le support inerte, en équilibre avec une phase mobile (solvant), qui chemine par capillarité.

Nous n'avons pas employé cette méthode pour obtenir des résultats quantitatifs; nous voulons simplement en effet identifier les corps en solution.

Il est à noter d'ailleurs que si la chromatographie est une méthode de séparation exallente par sa rapidité et sa précision (quand on choisit bien le solvant et le papier), elle est source de grosses erreurs (25% parfois) quand on l'emploie pour des mesures de concentrations directes.



- C concentration du produit
- z_1 zone où déceler
- z_2 zone décelé

Applications :

I Glucides dans les pétales de fleurs de lupin.

Le matériel végétal, après sa récolte, a été conservé dans l'alcool.

Lors de l'utilisation, il est décanté, puis traité pendant 20 minutes par l'alcool bouillant.

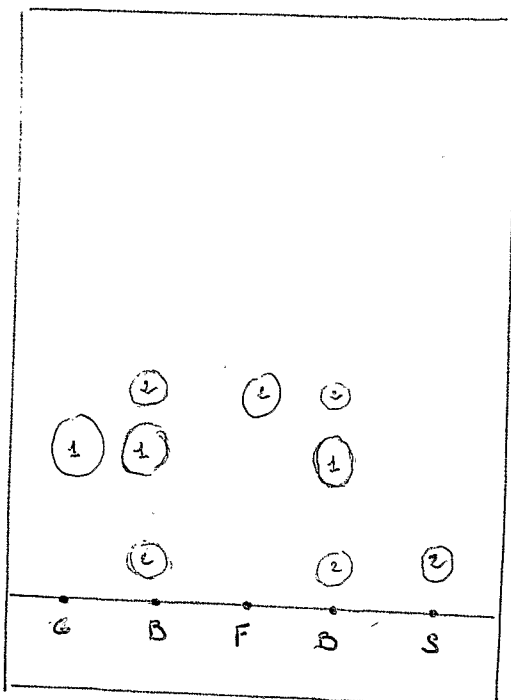
Distillation, puis défécation par le sulfate de zinc à 4% et la baryte saturée. On obtient ainsi les solutions
 A (lupin rose violet = fond blanc)
 B (lupin jaune)

déjà étudiés en polarimétrie et méthode Biot-Sarrasin.

Chromatogramme

- papier normal.
- solvant butanol + acide acétique + eau
- temps : 48 h.

- G glucose
 - F fructose
 - S saccharose
 - B lupin
-) témoins



Conclusion :

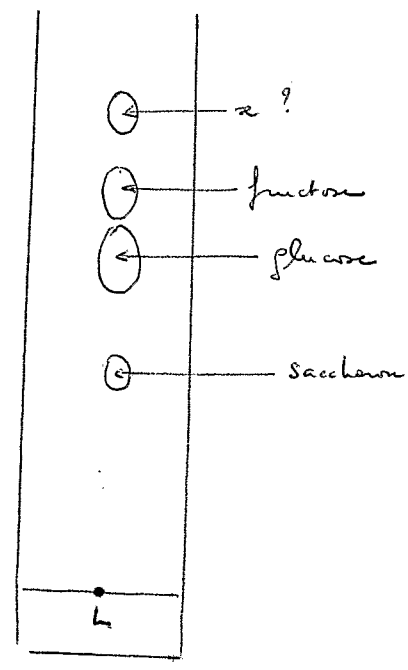
Présence de glucose, fructose, saccharose
celui-ci semblant en plus faible
quantité.

Des difficultés rencontrées dans la recherche des hétérosides dans les solutions A et B (cf infra) nous ont amenés à considérer une autre solution de lupin, non défilé, simplement filtré, que nous appellerons L (correspondant au lupin rose violet à feu? blanc)

Chromatogramme :

{ solvant : pyridine
 { papier rapide
 { 24 h.

D'où présence de glucose, fructose, saccharose, et d'un autre corps, peut être un sucre, de la hauteur de l'arabinose. La présence de cet autre corps est d'ailleurs confirmée par un deuxième chromatogramme semblable :



Remarque. Pour les sucres, le solvant qui m'a donné les meilleurs résultats est la pyridine, le papier employé était Whatman rapide, le temps 24 h. Les taches sont bien séparées, la méthode est donc recommandable.

II Hétérosides dans les pétales de fleurs de lupin.

Le but primitivement fixé était la recherche des différents hétérosides dans les pétales de fleurs de deux variétés de lupin. Nous n'avons pas été si loins. Après avoir rencontré des difficultés avec des solutions A et B, nous nous sommes arrêtés à la solution L (lupin non violet non défilé).

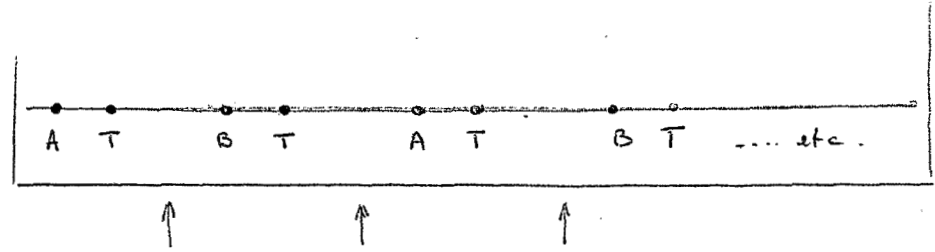
Recherche des hétérosides dans les solutions A et B.

Chromatogramme

- { papier rapide
- { solvant pyridine
- { 24 h.

T = glucose + fructose + saccharose

A et B : lupin -



Découper ensuite en lanière (suivant flèches)

Révélateurs :

acide sulfureux à 1% dans l'eau
révèle fructose, glucose, pas saccharose.

nitrite de sodium à 1% dans l'eau
ne révèle rien

acétate de plomb à 1% dans l'eau + quelques gouttes de H₂O₂

mélange boracique de Wilson
révèle saccharose et glucose ?

Cl₃Al en solution alcoolique à 1%
révèle glucose, fructose, saccharose.

Cl₃Fe en solution alcoolique à 1%

A donne une tache (arc) au départ

NO₃Ag, NH₃

A donne une tache à 10 cm du départ.

Conclusions :

les résultats sont à peu près totalement répétitifs. La défécation ayant peut-être été trop brutale, ou les hétérosides étant restés dans les produits de défécation, ce qui est plus probable, nous abandonnons les solutions A et B pour la solution L

Recherche des hétérosides dans la solution L :

Chromatogrammes :

- { T témoin salicylate + digitaline + gentiopicroine
- { L lupin

un chromatogramme

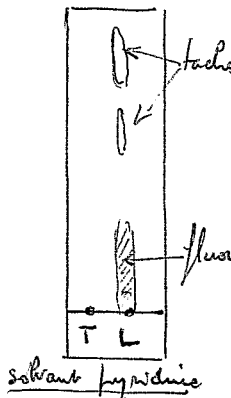
- { papier rapide
- { butanol

révèle une traînée à la lumière de Wood

un même chromatogramme

- { papier rapide
- { pyridine

révèle { une fluorescence en traînée vers le départ
{ deux taches

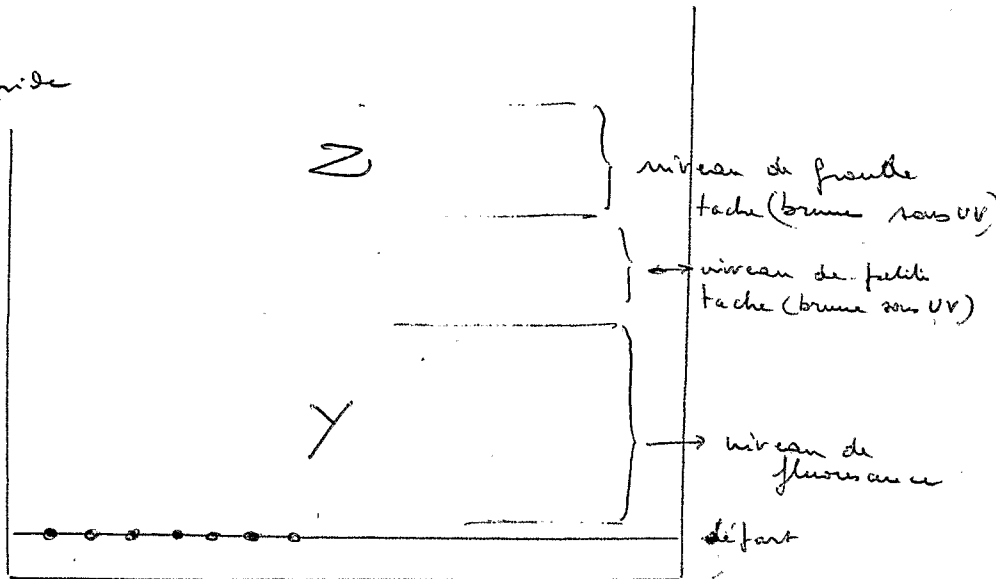


NB. attendre un certain moment avant de regarder à la lumière de Wood (1 heure) - la fluorescence est plus sensible.

Interprétation : il est possible que la fluorescence et les taches recèlent des hétérosides. D'où un chromatogramme pour élution.

Chromatogramme pour élution

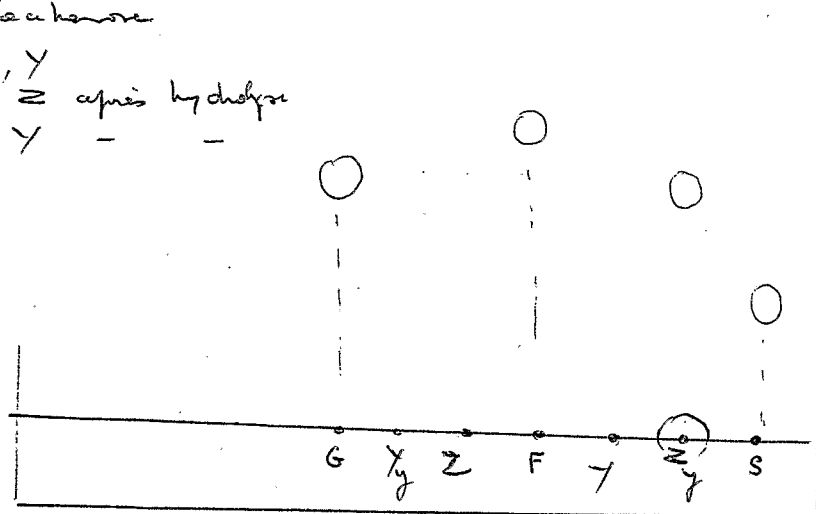
{ pyridine
 { papier rapide
 { 24 h.



élution : { Le niveau de la grande tache donne la solution Z . Hydrolyse $\rightarrow Z_y$
 { Le niveau de fluorescence donne la solution Y . Hydrolyse $\rightarrow Y_y$

Chromatogramme

{ G glucose
 { F fructose
 { S saccharose
 { Z, Y
 { $Z_y = Z$ après hydrolyse
 { $Y_y = Y$ - - -



Conclusions :

Y et Z donne une très légère fluorescence au départ (plutôt traitée)

Y_y de même

Z_y donne • au départ une tache revêtue brune par le phthalate d'aniline, et fluorescote sous U.V.
 • une tache de la hauteur du glucose

Interprétation :

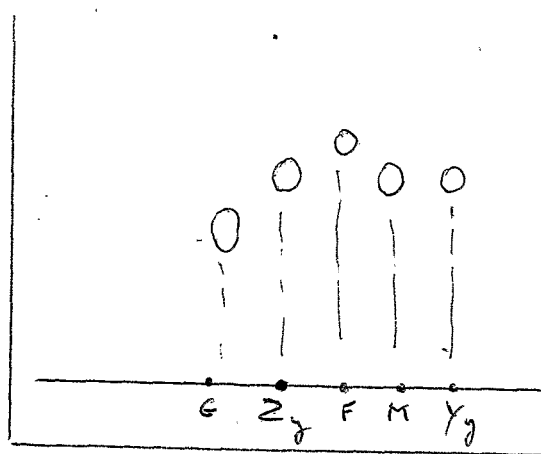
La tache brune et fluorescente au départ de Zy correspond-elle à l'alpha-glycane, à l'hétéroside, ou à l'alpha-glycane + hétéroside, celui-ci ayant été (observé seulement en fa) hydrolysé seulement en partie ?

Un même chromatogramme* refait deux semaines après ne donne plus de tache au départ.

D'où hydrolyse recommencée. (100° pendant 20 mn. au lieu de 70° pendant 15 mn.) La tache ne réapparaît pas davantage après cette nouvelle hydrolyse, sur un nouveau chromatogramme.

Mais un fait important : la séparation ayant été mieux faite, le sucre de Zy apparaît, non à la hauteur du glucose, mais à celle du mannose

NB. déjà dans le chromatogramme marqué ci-dessus d'un astérisque, on pouvait pressentir que le sucre était non du glucose, mais au sucre de la hauteur du mannose



G glucose
F fructose
M mannose

Conclusion : un seul fait positif : un sucre à la hauteur du mannose. A noter que ce sucre se trouve dans Zy et dans Yz

Conclusion générale sur les recherches des
hétérosides dans les fleurs de lupin.

La recherche des hétérosides est longue. Or nous n'avons pu faire des études poussées, c'est pourquoi les résultats sont faibles.

Deux remarques sont pourtant à faire :

- les hétérosides résistent mal à la défication ; ils semblent entraînés.
- la chromatographie semble être un moyen d'études excellent pour la séparation des hétérosides.

Une petite remarque : faire attention dans les manipulations, et principalement dans la préparation de chromatogrammes, que hétérosides et alycoses sont très peu solubles dans l'eau, et solubles dans l'alcool.

III Acides aminés dans des grains de soja

Deux variétés de soja sont étudiées : { Rouest 50 (nommé R)
Dickmann's (nommé D)

Les recherches durant ce stage portent sur :

l'azote dans les grains de soja

les dosages d'azote soluble, insoluble, total ont été faits ;

les résultats sont mentionnés plus loin.

l'identification des acides aminés a été faite par la chromatographie.

A. Acides aminés libres.

Les grains sont traités plusieurs fois par l'alcool. (Même traitement que pour le dosage de l'azote soluble).

Le filtrat est élué sur résine préalablement régénérée.

L'éluat sert pour la chromatographie, après évaporation et reprise par l'eau.

Remarque sur l'éluat.

Celle-ci se fait par NH_4OH N. Ne pas recueillir immédiatement l'éluat après avoir versé NH_4OH , car ce que l'on recueille au début, c'est l'eau précédemment versée (l'évaporation est très longue). Arrêter de recueillir quand l'éluat donne un pH 9-10 sur papier universel.

Chromatogrammes

{ Solvant butanol
papier rapide

Temps 30 - 40 heures : plus précisément 6 à 10 heures après que le front de solvant est arrivé en bas de feuille.

Révélateurs : { ninhydrine
isatine

Ces deux révélateurs se complètent assez bien. Si ensuite il y a litige pour un corps, essayer la chromatographie à deux dimensions.

Je ne donnerai pas les schémas de chromatogrammes obtenus. L'identification des acides aminés a été faite par comparaison de plusieurs chromatogrammes (différents solvants et chromatogrammes non personnels).

Résultats : dans l'ordre des R_F croissants :

<u>acides aminés probables</u>	<u>acides aminés moins probables</u>
leucine ou isoleucine	
Phenyl alanine	
-----	valine
-----	méthionine
tryptophane	
tyrosine	
α?	
β alanine	
glutamine ou acide glutamique	thréonine
glucosamine	glycocolle
arginine	acide aspartique
	asparagine
lysine	
cystéine	cystine

Les résultats sont les mêmes pour Roust 50 et Dickmann's

Remarque

l'acide aminé nommé se dans la liste de
acides aminés probables est à l'autre (de glycocolle -)
de la proline. Mes chromatogrammes révèlent une
tache de couleur différente (nicotrine et isatine).
D'autres obtiennent avec l'isatine une couleur semblable.
Nous n'avons pu conclure si il s'agit de proline
ou d'une autre chose.

B. Acides aminés obtenus par hydrolyse des protéines

des graines de soja, nous l'avons vu, ont été
traités par l'alcool bouillant. On filtre. Le
résidu sec ne contient plus les acides aminés libres,
mais contient les protéines.

Hydrolyse des protéines. (Cl H 6 N et 24 heures dans
l'éthanol à 105° , bien bouché). Une première hydrolyse
ayant donné des chromatogrammes sans conclusions
possibles (absence d'acides aminés dans l'hydrolysate
ou élution mal effectuée sur résine, ce qui est plus
probable), une deuxième hydrolyse a été faite, celle-ci
donnant des résultats valables.

Élution par NH_4OH sur résine.

Chromatogrammes : même chose que pour la
chromatographie des acides aminés libres.

Résultats :

par ordre de R_F croissants :

<u>acides aminés probables</u>	<u>acides aminés moins probables</u>
Leucine	Isoleucine
Phénylalanine	
Valine	méthionine
tyrosine	
α (haut en de proline)	β alanine
acide glutamique ou glutamine	arginine
acide aspartique	glycocolle
asparagine	serine
cystine ou cysteine	

Remarque : dans un chromatogramme révéle à l'iodation, α donne une tache couleur et haut en de la proline.

Conclusions générales sur le soja et ses acides aminés :

- o des ressemblances entre le tableau des acides aminés libres et celui des acides aminés de protéines sont beaucoup plus frappants que les différences.
- o On peut donc conclure que les acides aminés de protéines se retrouvent dans les acides aminés libres, et réciproquement, ceci étant d'ailleurs énoncé sans réserve.
- o d'autre part, les différences entre plusieurs variétés sont trop peu sensibles pour qu'on puisse tirer des conclusions.

Dosage d'azote total, d'azote soluble, d'azote insoluble
dans un matériel végétal.

~~Il y a des erreurs dans ce document~~

Application : grains de soja variétés { Rouest 50 (R)
Dickmann's (D)

Azote total

Méthode de Joldbauer

attaque de 100 mg de grains broyés

Trois expériences sur chaque variété.

Azote soluble - Azote insoluble

Séparés par traitement à l'alcool bouillant.

Filtration ; celle-ci est très longue (une journée). Filtrer

sous vide. Ajouter de la poudre de Kieselgur pour empêcher la formation de colloïdes colmatant le filtre.

Méthode de Joldbauer ensuite.

Résultats en mg d'azote / ~~litre~~ gramme de grains

	<u>N soluble</u>	<u>N insoluble</u>	<u>N total</u>
R	2,94	50,3	67
D	2,1	47,5	57,5

Recherche, extraction et dosage de CNH

Application : amande amère.

- mise en évidence de CNH, qualitativement, par le papier picrosside.
- extraction
- dosage

Résultat

2,7 mg CNH / g d'amande amère

Lipides

Extraction et dosage

Application Arachide (gourmes)

Résultats

Taux d'humidité 5,9 %
 Taux de matière grasse dans la matière sèche 50,5 %

Principaux indices des matières grasses

Application une huile d'arachide (Leaure)

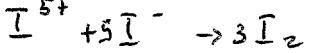
Résultats

Indice d'acide = 0,88
 Acidité (oleique) = 0,44
 Indice de saponification = 187,6
 Indice d'iode = 78,7

Remarques :

- l'huile étant rance, l'indice d'iode a baissé.
- dans la mesure de l'indice d'iode, on titre $S_2O_3Na_2$ en utilisant IO_3K .

Prendre garde qu'une solution normale de IO_3K contient $\frac{1}{5}$ de molécule gramme / litre, dans la réaction



Mais n'en pas mettre en grand excès, car $I^{5+} + 2I_2 \rightarrow 5I^{-}$

Mesure du pH

• pH mètre on étalonne l'appareil avant de faire une mesure, avec une solution de pH connu et voisin de pH de la solution à mesurer.

• papier indicateur de pH.

- papier universel

- papier lyphane zones de pH réduits.

• tubes de Gillespie, avec des indicateurs variant suivant la zone de pH.

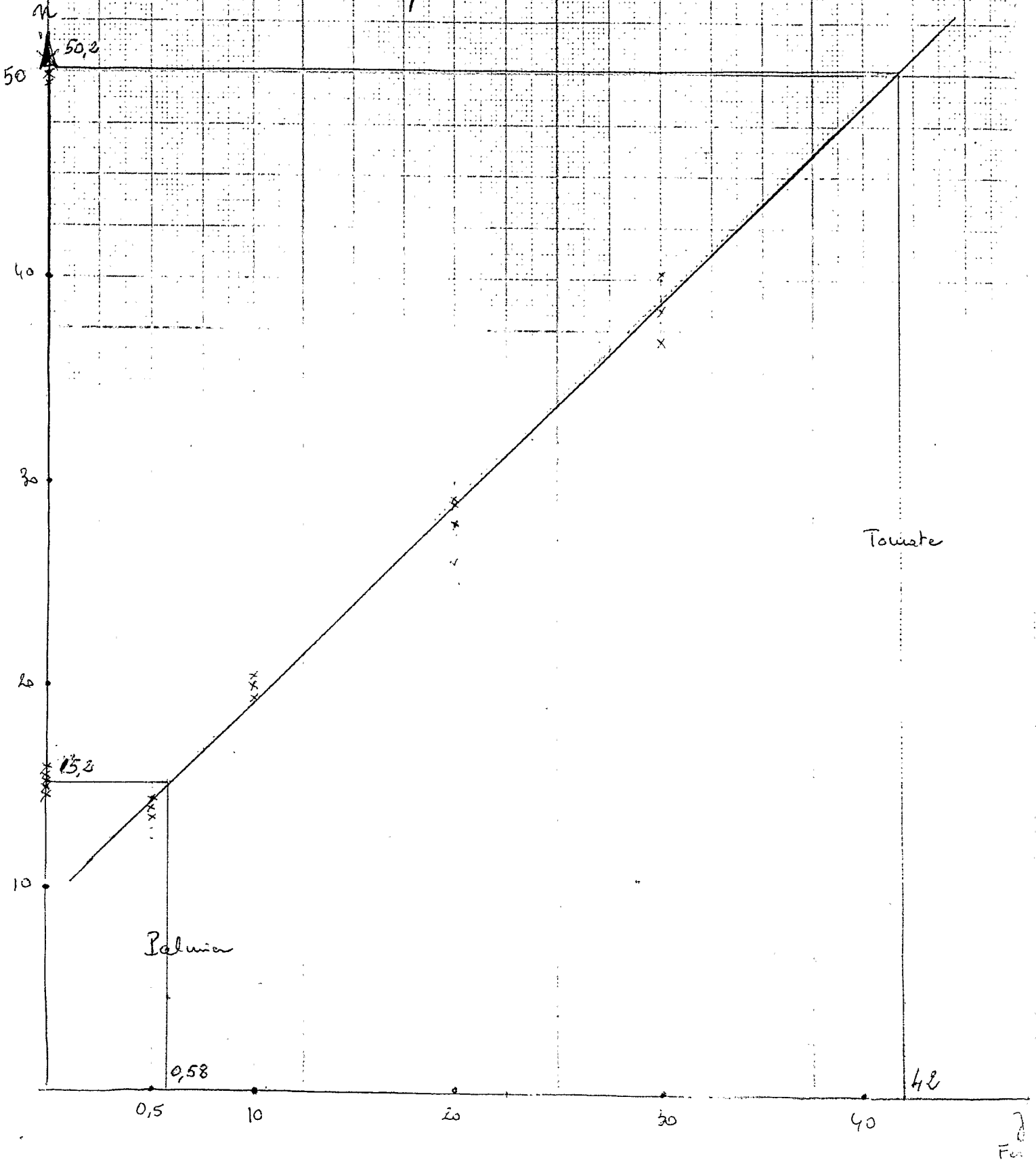
Applications : solutions données à mesurer :

1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D.

Résultats : pH =

	papier universel	papier lyphane	Gillespie	pH mètre	pH mètre étalonné	valeur probable du pH.
1	2	1,9 - 2,2	2	2,65	2,0	2
2	4-5	6,5	6,5	7,6	7	6,7
3	3-4	3,5	3	3,5	2,9	3
4	10	>10	>10	10,6	10,2	10,2
5	7-8	7,5	8,4	8,8	9,5	8,4
6	8-10	8,8	9	8,2	9,5	8,2
A	9	9,4	>9,6	9,85	9,9	9,6
B	5	5,8	6,1	6,45	5,95	6,1
C	4	3,9	3,9	4,65	3,8	3,9
D	8-9	8,1	8,2	8,7	8,1	8,2

Dosage du fer
Spectrophotométrie de Heuvel



Alcaloïdes

Application : dosage de la quinine dans les écorces de quinquina

Résultats : Teneur en alcaloïdes totaux : 5,8 % Teneur en quinine de l'écorce sèche : 2,08 %

Dosage

Electrophotométrie de Mercurier

Application : dosage du fer dans des solutions données
(provenant de tomate et palmier)

on prépare des solutions étalons d'un complexe
fer ferrous - orthophenantroline.

On trace la courbe

$$m = f(\text{concentration en fer})$$

$$m = \text{lecture au tambour}$$

On mesure m pour les solutions données. On
lit sur le graphique la concentration correspondante

Voici la courbe sur papier millimétré.

On obtient pour la solution de

- tomate $m = 50,2 \rightarrow \gamma : 42$
- palmier $m = 15,2 \rightarrow \gamma : 0,58$

Si je rapporte aux solutions données, j'obtiens :

Fer :	Palmier : 0,3 γ / g de Matière sèche
	Tomate : 16 γ / g de Matière sèche