

LES HETEROSIDES CYANOGENETIQUES

RECHERCHE, EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE VEGETALE

Dirigés par Mlle D. SCHEIDECKER

Assistée par Mlle M. BOULOUX

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° 29409 ex 1

Cote B

LES HÉTÉROSIDES CYANOGENÉTIQUES

RECHERCHE, EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE

TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE VÉGÉTALE

Dirigés par Mlle D. SCHEIDECKER

Assistée par Mlle M. BOULOUX

L'acide cyanhydrique, $H - C = N$, peut exister à l'état libre (certaines Aroïdées, etc.). Mais c'est à l'état de combinaison hétérosidique qu'on le rencontre dans plus de 200 espèces réparties dans une cinquantaine de familles phanérogames, notamment Rosacées (amandes amères, graines de fruits à noyaux, feuilles de laurier-cerise, etc); Légumineuses (*Phaseolus lunatus*), Euphorbiacées (Maniocs).

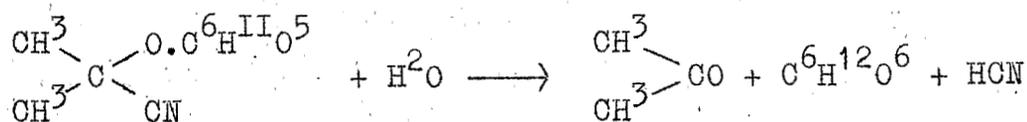
Dans ces plantes on a à faire à un hétéroside azoté (aglycone relié au carbone 1 de l'ose par l'intermédiaire d'un atome d'azote) à aglycone noyau cyanhydrique (HCN pouvant être accompagné d'acétone, d'aldéhyde benzoïque ou d'une autre substance).

Ces hétérosides cyanogénétiques libèrent l'acide cyanhydrique par hydrolyse, l'agent hydrolysant pouvant être un acide ou un enzyme (enzyme naturel du végétal ou enzyme étranger).

Cas des Maniocs. C'est un cas qui pourra se présenter souvent dans la pratique en territoires tropicaux.

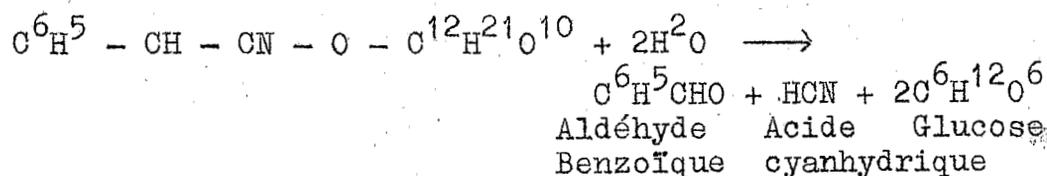
Tous les maniocs renferment un hétéroside azoté qui a été identifié avec le phaséolunatoside du Haricot toxique (*Phaseolus lunatus*). Les maniocs doux en renferment très peu, mais les maniocs amers sont toxiques et ne peuvent être consommés sans danger qu'après action de la chaleur.

Le broyage met en contact avec la substance glucosidique une diastase hydrolysante (émulsine) et le phaseolunatoside donne par hydrolyse de l'acide cyanhydrique, de l'acétone et du glucose:



Cas des Amandes Amères. C'est le cas le plus facile à étudier ici à titre d'exemple.

Dans les amandes amères, comme dans la plupart des graines de Rosacées, on trouve de l'amygdalosite. L'enzyme qui agit pour hydrolyser cet hétéroside et qui se trouve aussi dans l'amande, l'émulsine n'entre en contact avec lui qu'après broyage des tissus. La réaction suivante se produit alors:



PROBLEMES ANALYTIQUES POSES PAR LES PLANTES A HETEROSIDES
CYANOGENETIQUES.

(Référence: G.Dillemann: "Recherches biochimiques sur la transmission des Hétérosides cyanogénétiques par hybridation interspécifique dans le genre *Linaria*".
Thèse - Fac. Sciences Paris. 1953. Librairie Générale de l'Enseignement, 4, rue Dante, Paris, V°)

Le tout n'est pas de disposer de méthodes satisfaisantes pour la recherche et le dosage de l'acide cyanhydrique; il s'agit avant tout de connaître les conditions à réaliser pour soumettre intégralement à ces méthodes tout l'acide cyanhydrique présent dans l'échantillon végétal à étudier.

C'est le problème le plus délicat. Il faut savoir qu'il est très difficile de soumettre à une méthode analytique appropriée la totalité de l'HCN potentiel d'une plante. Il faut savoir aussi que ce sont les opérations préliminaires qui sont capitales.

Il s'agit d'abord de libérer HCN. La première question à résoudre est celle du choix de l'agent hydrolysant (acide, enzyme qui accompagne le principe cyanogénétique chez le végétal ou enzyme étranger). Il faut décider ensuite des modalités du contact entre l'agent hydrolysant et l'hétéroside (macération, chauffage avec de l'eau, destruction mécanique des tissus, action du gel ou de certains liquides et vapeurs organiques) et fixer les conditions optimum de l'hydrolyse (concentration de l'agent hydrolysant, température, pH, durée).

Il ne suffit pas d'obtenir une hydrolyse complète de l'hétéroside. Il faut aussi empêcher la disparition de l'acide libéré. Il peut y avoir des pertes par volatilité ou par "disparition" (un certain nombre d'espèces, cyanogénétiques ou non, ont la propriété de détruire ou de transformer une partie de l'HCN introduit dans les macérations aqueuses de leurs tissus broyés. On ne connaît pas le mécanisme de cette action. Les auteurs qui ont écarté la possibilité d'une action enzymatique, n'ont pu trouver aucune autre explication valable à cette disparition de l'HCN).

L'HCN une fois libéré, et toutes les précautions prises pour sa conservation, il faut, pour pouvoir le doser, le transporter dans un milieu convenable (généralement constitué par de la lessive de soude diluée dans de l'eau distillée).

...

On dispose de deux procédés pour effectuer le transport de HCN: la distillation et l'entraînement par l'air.

Dillemann indique que:

"La méthode idéale de transport devrait permettre d'enlever du milieu d'hydrolyse la totalité de l'acide cyanhydrique, aussi bien celui qui est libre que celui qui est combiné avec des aldéhydes ou des cétones sous forme de cyanhydrines, et de le recueillir dans un volume aussi réduit que possible, à l'état pur, c'est à dire sans que d'autres substances soient transportées en même temps que lui.

.....

La distillation permet un entraînement quantitatif de l'acide cyanhydrique, à la condition d'être suffisamment prolongée et quand la quantité à entraîner n'est pas trop faible. Le distillat est parfois impropre à l'emploi de certaines méthodes analytiques.

Quand il s'agit d'entraîner des quantités d'acide cyanhydrique inférieures à 1/10^e de mg, cette méthode donne de mauvais résultats à cause de la présence possible de composés réducteurs dans le distillat et à cause du trop grand volume de distillat nécessaire pour un entraînement intégral.

.....

La méthode de l'aération est excellente avec certaines plantes et elle doit alors être préférée à la distillation. Par contre, avec d'autres espèces, elle conduit à des résultats médiocres ou même franchement mauvais."

Et Dillemann conclut:

"On voit... combien il est difficile de soumettre à une méthode analytique appropriée la totalité de l'acide cyanhydrique potentiel d'une plante et aussi l'importance des "opérations préliminaires". La meilleure méthode est évidemment celle qui donne la valeur la plus élevée d'acide cyanhydrique, sans qu'on soit jamais sûr que cette valeur corresponde à la totalité de l'acide potentiel. Mais d'autre part, la méthode reconnue comme la meilleure pour une plante donnée ne le sera pas nécessairement pour une plante d'une autre espèce. Il n'y a pas, dans l'état actuel de la question, une méthode de choix pour le dosage de l'acide cyanhydrique des plantes.

...

Il y a seulement un certain nombre de faits dont on doit tenir compte, pour chercher, dans chaque cas, la meilleure méthode."

DETERMINATION DE LA TENEUR EN ACIDE

CYANHYDRIQUE DES MANIOCS

Deux méthodes sont reconnues officiellement pour la détermination de l'acide cyanhydrique des maniocs:
(Décret n°48-282 du 16 février 1948 publié au J.O. du 19 février 1948 et rectificatifs parus au J.O. des 27 février et 5-6 avril 1948).

- Une méthode colorimétrique qui consiste à comparer la coloration que prend une solution picrosodée sous l'influence de l'HCN contenu dans les maniocs à celle d'une solution étalon colorée et stable de bichromate de potassium.

- Une méthode plus précise de détermination de l'HCN après hydrolyse enzymatique, puis acide et distillation. L'acide est recueilli dans une solution alcaline et titré par la méthode cyanoargentimétrique de Denigès.

Le détail de ces méthodes est décrit dans Brunel, Traité pratique de Chimie Végétale, Tome IV, Pages 540-543.

RECHERCHE ET DOSAGE DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE

DANS LES AMANDES AMERES

Recherche Qualitative

- Méthode au papier picro-sodé.

Principe. En présence d'un alcali ou d'une base, l'acide picrique mis en présence d'HCN donne une coloration rouge sang intense due à la formation d'un acide, l'acide isopurpurique.

La spécificité de cette méthode a été discutée. Des corps autres que l'isopurpurate pourraient donner une coloration analogue (même avec le papier préparé suivant les indications ci-dessous). D'après Denigès, une réaction complémentaire permettrait de savoir s'il s'agit bien d'un isopurpurate. Quoiqu'il en soit, Dillemann

conclut que cette méthode: "... permet d'être certain qu'il n'y a pas d'acide cyanhydrique libéré, dans la limite de sa sensibilité, quand la réaction est négative, puisque l'absence de coloration rouge, produite par l'isopurpurate ou par le picramate, prouve l'absence d'acide cyanhydrique aussi bien que celle d'autres substances réductrices. En outre, on peut également être certain de la valeur de cette méthode, quand il s'agit simplement de vérifier la présence d'acide cyanhydrique chez des individus appartenant à une espèce dans laquelle l'existence d'un principe cyanogénétique a déjà été démontrée".

Préparation du papier micro-sodé. Plonger les bandes de papier filtre dans une solution aqueuse d'acide picrique à 1% (préparée à chaud). Les faire sécher à l'abri de la lumière sur papier buvard. Les tremper ensuite dans une solution à 10% de carbonate de sodium, puis les sécher comme précédemment.

Si une solution cristallise par refroidissement, redissoudre par un léger chauffage au moment de l'emploi.

(On prépare le papier réactif avec du carbonate de soude car ainsi, d'après Guignard: "Le gaz sulfhydrique, qui donne avec l'acide picrique et les alcalis une coloration rouge due à l'acide picramique, ne le colore pas; la coloration pourrait apparaître s'il était préparé, non avec du carbonate de soude, mais avec une solution d'alcali caustique").

Mode opératoire. Broyer 5 g d'amandes, en présence de sable de Fontainebleau, dans un mortier de porcelaine. Les introduire dans un ballon de 100cc. Ajouter 5 cc d'eau (on doit obtenir une bouillie claire). A la partie inférieure d'un bouchon s'adaptant sur le ballon, on suspend une bandelette de papier picrosodique. Boucher le ballon, et l'abandonner un jour. S'il se forme de l'acide cyanhydrique, le papier se colore en rouge sang.

- Méthode du Bleu de Prusse.

Elle est fondée sur la propriété des cyanures alcalins, traités par les sels ferreux, d'être transformés en ferrocyanures dont le sel ferrique, insoluble en milieu acide est bleu (bleu de Prusse).

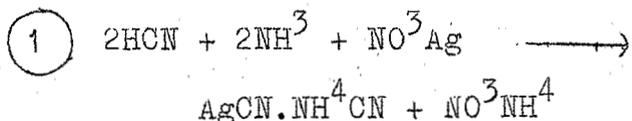
Elle est beaucoup plus délicate à appliquer que la précédente sur du matériel végétal, avec un seuil de sensibilité satisfaisant.

Elle demande une extraction préalable et un certain seuil de concentration. Certains procédés ont cherché à éviter cette extraction d'HCN à partir du milieu complexe où il s'est formé, par l'emploi d'un papier réactif; mais cette méthode est beaucoup moins sensible que le procédé au papier picro-sodé.

Extraction et Dosage

Principe. L'Amygdalosite des amandes amères est hydrolysé en macération aqueuse, après broyage, par l'émulsine contenue dans les tissus eux-mêmes (sans addition d'enzyme supplémentaire ou étranger, ou d'acide). L'HCN libéré est transporté par entraînement à la vapeur dans le milieu convenable pour le dosage.

Le dosage lui-même est exécuté suivant la méthode argentimétrique de Liebig-Denigès, classique pour le dosage de HCN libéré par les végétaux (elle est également retenue par le Codex français pour le dosage de l'Eau de Laurier-Geise). Elle repose sur la propriété du nitrate d'argent de fournir, avec les cyanures alcalins, des cyanures doubles solubles qui sont décomposés par un excès de nitrate d'argent en donnant un précipité de cyanure d'argent. On opère en milieu ammoniacal qui maintient en dissolution le cyanure d'argent et on utilise l'iodure de potassium comme indicateur. Quand tout le cyanure est transformé en sel double, l'excès de nitrate d'argent forme, avec l'iodure de potassium, un précipité blanc jaunâtre d'iodure d'argent qui indique la fin de la réaction.



Il faut savoir que cette méthode ne possède pas toutes les qualités désirables. Elle ne donne des résultats convenables qu'avec les espèces - assez rares - qui sont riches en principes cyanogénétiques. Pour les autres on se heurte à toute une série de difficultés. D'abord à son manque de spécificité. Dillemann souligne que: "De faibles valeurs, obtenues par le titrage d'un distillat de plantes, ne prouvent absolument pas la présence d'acide cyanhydrique. Les substances réductrices ou autres, que contiennent souvent les distillats de plantes, peuvent avoir une influence non négligeable sur le titrage, en décalant le virage ou en rendant même

...

impossible son observation". D'autre part sa sensibilité est également insuffisante dans la plupart des cas. Et les substances nuisibles au dosage, entraînées par la distillation avec HCN, ne permettent pas d'utiliser des solutions de nitrate d'un titre plus faible.

Réactifs nécessaires - Ammoniaque pure
- Solution à 10% d'iodure de potassium
- Lessive de soude concentrée à 30% R.P.
- Nitrate d'argent N/10

Marche des Opérations (voir schéma de l'appareillage)

Broyer au mortier, en présence de sable, 15g d'amandes. Les introduire dans un ballon pour entraînement à la vapeur de 500cc. On ajoute l'eau de lavage du pilon et du mortier (50cc employés en deux fois) et abandonne le ballon, bien bouché pendant 24 h à la température ordinaire. On adapte alors au ballon son bouchon rodé, et le relie au générateur de vapeur. On chauffe légèrement le ballon contenant le lait d'amandes pour éviter une trop forte condensation de la vapeur d'eau.

Au début, le liquide mousse abondamment. Il faut avoir soin de réunir le générateur de vapeur au ballon par un caoutchouc assez long pour pouvoir couper instantanément l'arrivée de la vapeur, si la mousse menace de passer dans le réfrigérant. Lorsque les substances protéiques sont coagulées, la distillation se fait régulièrement.

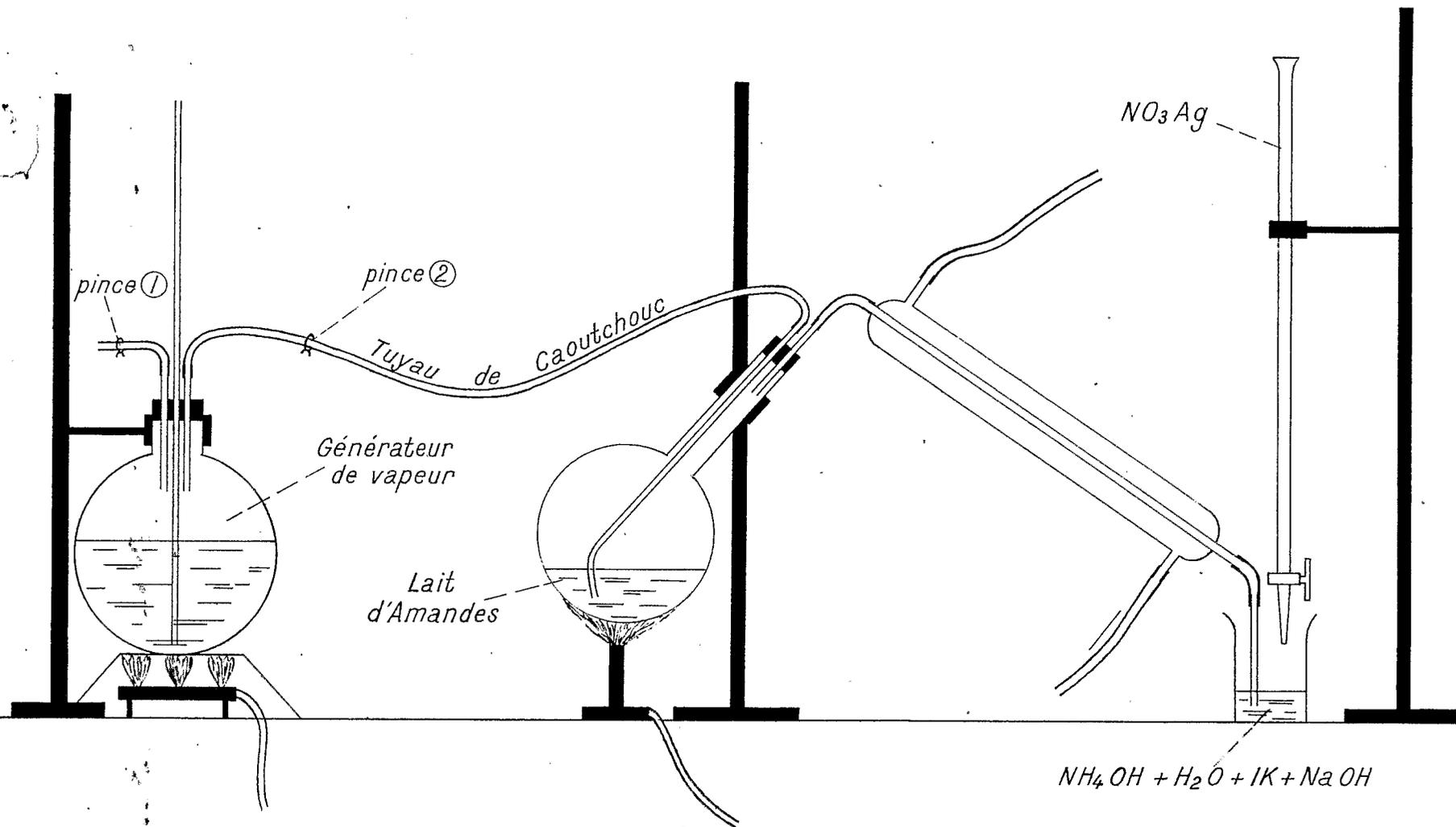
Le liquide condensé dans le réfrigérant arrive, par un tube à entonnoir coudé, au fond d'un verre contenant 10 cc d'ammoniaque, 10cc d'eau distillée, 1 cc d'une solution à 10% d'iodure de potassium et 10 à 15 gouttes de lessive de soude concentrée à 30%.

Dès le commencement de la distillation, on verse, au moyen d'une burette, en agitant constamment, une solution N/10 de nitrate d'argent, jusqu'à léger trouble. Celui-ci se redissout dans le liquide qui continue à distiller. On ajoute goutte à goutte la solution de nitrate d'argent tant que le trouble se redissout, et l'on s'arrête lorsqu'il y a formation d'une légère opalescence persistant quelques minutes. On interrompt alors la distillation.

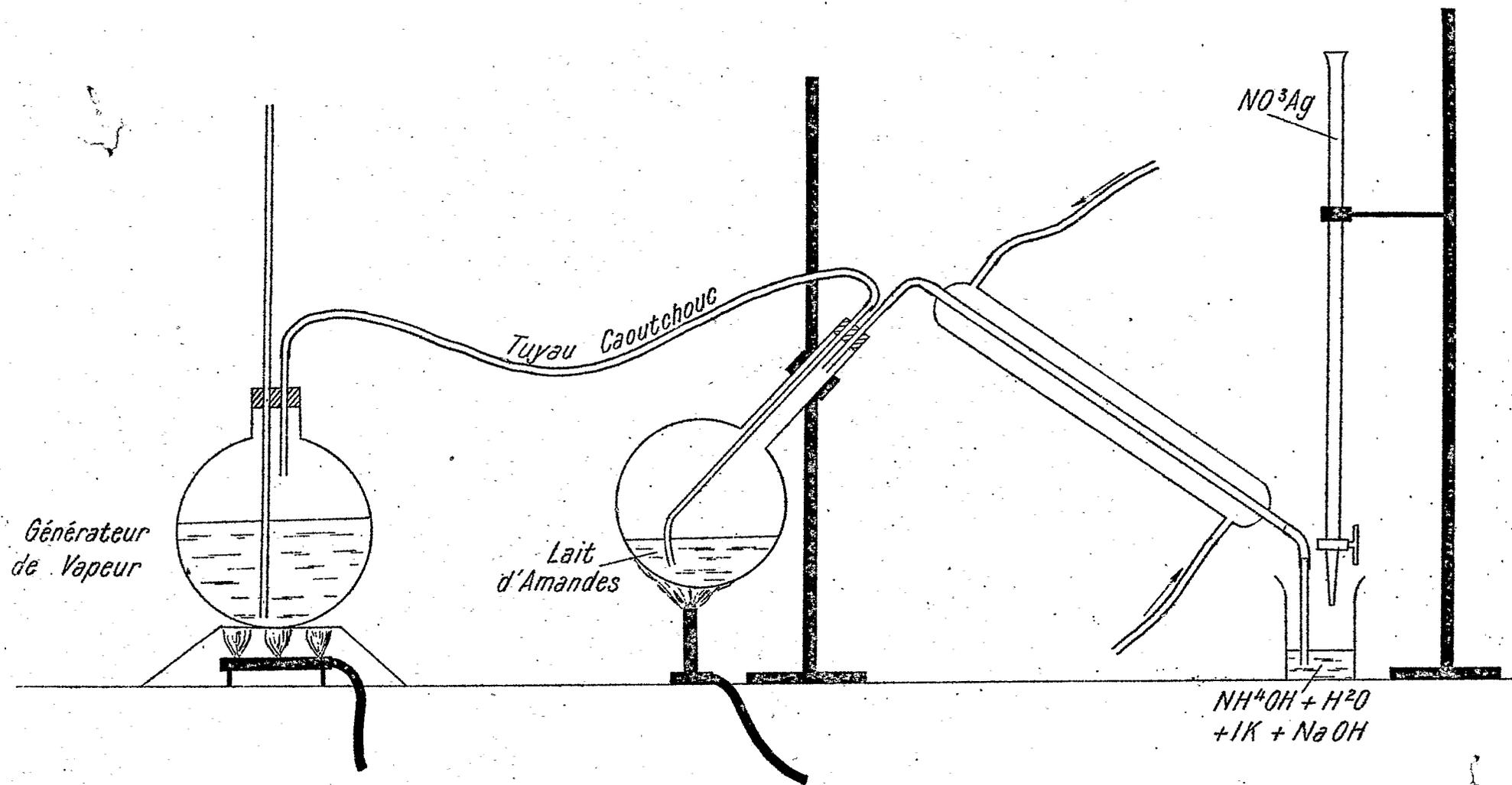
(Se servir d'un fond noir pour le titrage).

...

Fermer ② en ouvrant ①

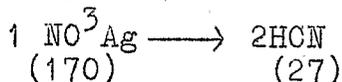


Montage pour distillation et dosage de HCN



Montage pour distillation et dosage de HCN

Calculs. D'après la formule (1):



1 Litre NO³Ag N = 170 g. NO³Ag

1 cc NO³Ag N/10 = 17 mg NO³Ag → 5,4 mg HCN

Si: n = nombre cc. NO³Ag N/10 utilisés

p = poids amandes de la prise

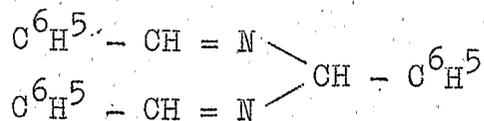
la teneur en HCN pour 100g. d'amandes sera, en grammes:

$$\frac{n \times 100 \times 0,0054}{p}$$

Remarque. L'aldéhyde benzoïque et l'acide cyanhydrique provenant de l'hydrolyse de l'amygdalosite sont volatils. Ils distillent tous les deux et se recombinent ensuite, en partie, formant ainsi un nitrile.

Le distillat contient donc un mélange d'aldéhyde benzoïque, d'acide cyanhydrique et de nitrile.

En présence d'un excès d'ammoniaque, l'aldéhyde benzoïque, C⁶H⁵ - CHO, donne de l'hydrobenzamide:



qui précipite en donnant un trouble blanchâtre de même apparence que le trouble dû à l'iodure d'argent. Pour éliminer cette cause d'erreur on ajoute de la lessive de soude au distillat: elle empêche la formation de cette hydrobenzamide. D'autre part elle détruit en même temps le nitrile et on dose ainsi l'HCN total et pas seulement l'HCN libre.

PREPARATION D'UNE SOLUTION TITREE DE NITRATE D'ARGENT.

"On peut peser du nitrate d'argent de pureté garantie pour constituer une solution titrée. S'il est humide, le pulvériser et

le sécher à 110°; cependant les dernières traces d'eau, 01 à 0,2%, ne disparaissent qu'au point de fusion à 208°. La fusion doit être effectuée à l'abri des poussières; on ne doit pas dépasser 250°. La solution de nitrate d'argent se conserve très bien à l'air, à l'abri de la lumière. Elle peut être vérifiée au moyen des solutions de ClNA , ClK , BrK , IK . On a ces sels à l'état de pureté garantie et on peut les peser. Ils sont chauffés à 500-600° pour chasser les dernières traces d'eau, s'il y a lieu".

(G. Charlot et D. Bézier, Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale, Page 124).

Cette méthode semble devoir donner pratiquement des résultats aussi précis que celle, théoriquement plus rigoureuse, qui consiste à faire une solution argentique étalon, obtenue à partir d'argent vierge, pour titrer une solution de sulfocyanure d'ammonium qui sert ensuite elle-même à titrer une solution de nitrate d'argent, obtenue à partir d'un sel du commerce.