

GEMBLoux AGRO-BIO TECH – UNIVERSITÉ DE LIÈGE

TP DE CHIMIE BIOLOGIQUE

2^{ÈME} PARTIE

PROF. M. PAQUOT

IR. S. GILLET

TP1 : Extraction et dosage des sucres par HPAEC - PAD.

1. Principe

La manipulation consiste à extraire les monosaccharides d'une matrice afin de les quantifier à l'aide d'une technique chromatographique basée sur l'échange d'ions. La technique (HPAEC – PAD) sera présentée en auditoire.

Les étudiants seront contrôlés sur le dosage des sucres de l'échantillon inconnu ainsi que sur la préparation d'une solution de standard et d'une solution test de glucose. Ils seront également évalués sur la qualité du rapport de labo.

2. Réactifs

- glucose, fructose, saccharose, lactose, galactose
- eau distillée
- réactifs à HPAEC-PAD (déjà préparés)

3. Extraction

Remarques :

- 1. Vérifier dans le tableau affiché sur la hotte, la dilution finale à obtenir. Elle peut, selon les cas, différer de celle proposée dans les notes ci-dessous**
- 2. Incrire systématiquement sur la verrerie et les vials : N° Echantillon / N° d'équipe.**

Pour les fruits à jus et les liquides :

- A.** presser le fruit dans un bécher ou prendre le tube échantillon correspondant.
- B.** prélever avec précision 200 µl de liquide surnageant avec une pipette automatique et les mettre dans un ballon jaugé de 100 ml.
- C.** mettre au volume avec de l'eau.
- D.** boucher et agiter le ballon.
- E.** ajouter 2000 µl de la solution précédente dans un ballon jaugé de 10 ml.

- F. mettre au volume avec de l'eau.
- G. boucher et agiter le ballon.
- H. filtrer 1,5 ml sur 0,2 μm dans un vial HPLC.

Pour les solides :

- A. broyer le solide.
- B. peser avec précision environ 200 mg de solide dans un bécher.
- C. ajouter 60 ml d'eau.
- D. agiter au moyen d'un barreau magnétique sans perdre d'échantillon (évent. avec un ultraturrax).
- E. enlever le barreau et le rincer à l'eau au dessus du bécher.
- F. transférer quantitativement la solution dans un ballon jaugé de 100 ml.
- H. mettre au volume avec de l'eau.
- I. continuer les étapes E à H des liquides.

4. Préparation des standards

Peser avec exactitude les sucres suivant pour obtenir une concentration d'environ 1000 ppm pour le glucose, 1000 ppm pour le fructose, 2000 ppm pour le saccharose et 2000 ppm pour le lactose dans un ballon de 100 ml.

(= solution de base SB)

Remarque : 1 Ppm = 1 mg/l.

<u>Solutions standards</u>	<u>SB</u>	<u>Porter à</u>
Std 1	50 μl	10 ml
Std 2	100 μl	10 ml
Std 3	250 μl	10 ml
Std 4	500 μl	10 ml
Std 5	1000 μl	10 ml

Il sera demandé aux étudiants de préparer uniquement une solution standard au choix. Référez-vous au tableau affiché sur la hotte.

5. Préparation de la solution test de glucose

A. Préparer avec précision une solution d'environ 360 ppm en glucose dans un ballon de 100 ml.

B. Prélever 1 ml de cette solution et l'introduire dans un ballon jaugé de 10 ml. Mettre au volume avec de l'eau = solution test glucose

6. Analyse

L'appareil et les conditions opératoires seront présentés au TP. Le pH et la quantité de contre-ions injectés sont bien sûr les paramètres les plus importants sur lesquels il faut jouer pour garantir une séparation optimale des sucres.

7. Résultats

La méthode utilisée ici pour le dosage quantitatif des différents sucres est la calibration externe. Elle consiste à préparer des solutions standards de concentrations connues contenant les différents sucres que l'on souhaitera doser dans un échantillon. Plusieurs solutions standards de concentrations croissantes (et connues) seront donc préparées et injectées en HPAEC-PAD. Il sera ainsi possible, pour chaque sucre, de mettre en relation une concentration donnée avec une aire observée sur le chromatogramme.

La droite obtenue par cette méthode permettra de déterminer la concentration d'un échantillon inconnu à partir de son aire sous son pic.

Pour identifier correctement un pic dans un mélange complexe, il faut au préalable déterminer l'ordre d'élution des différents sucres. Pour ce faire, des solutions contenant chacun des sucres séparément ont été injectées au préalable. Le temps de rétention de chaque sucre a ainsi pu être obtenu et chacun d'eux pourra être repéré sur un chromatogramme contenant un mélange de plusieurs sucres. L'ordre d'élution est le suivant : glucose, fructose, lactose et saccharose.

TP2 : Dosage des monosaccharides par CPG

1. Principe

Les polysaccharides sont des chaines de sucres (de monosaccharides) reliés par des liaisons glycosidiques. Les polysaccharides diffèrent par la nature des sucres qui les constituent, le type de liaison entre les monosaccharides, etc. La liaison entre deux sucres simples d'un polysaccharide peut-être clivée enzymatiquement, chimiquement ou même physiquement (T° et P). Cela va libérer un ensemble de monosaccharide dont le ratio caractérise le polysaccharide. Le pourcentage de polysaccharides d'un échantillon peut ainsi être estimé par un bilan massique entre la quantité de monosaccharides analysée et la pesée de départ de l'échantillon.

Au labo, un polysaccharide inconnu va être hydrolysé en monosaccharides qui vont ensuite être dosés par chromatographie en phase gazeuse après dérivatisation en acétates d'alditols (figure 1). Cette étape est nécessaire car le sucre « tel quel » n'est pas volatil et ne peut donc pas être analysé en GC. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne permet pas de faire la distinction entre le glucose et le fructose, après dérivatisation. Les grands principes de la chromatographie en phase gazeuse seront présentés en auditoire.

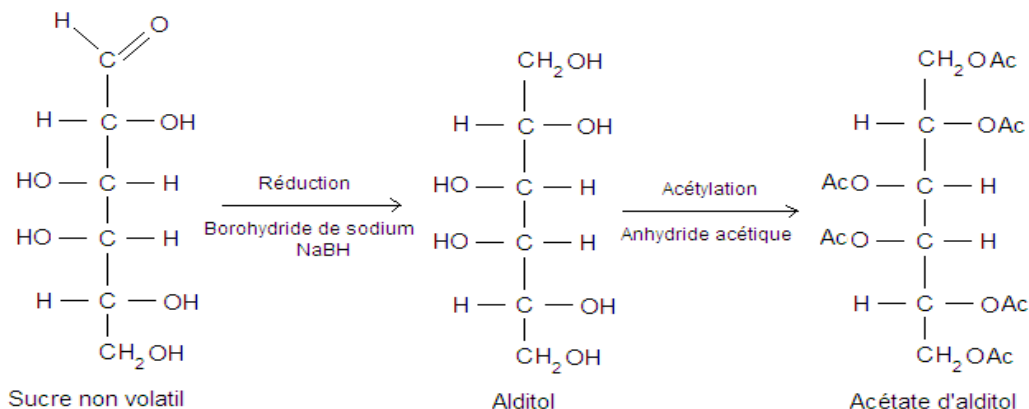


Figure 1 : transformation d'un monosaccharide en acétate d'alditol, pour analyse GC-FID.

Les étudiants seront évalués sur le dosage des monosaccharides obtenus après hydrolyse, sur le ratio en sucre (et donc l'origine) du polysaccharide, sur le pourcentage de saccharides dans l'échantillon de départ ainsi que sur la qualité du rapport de labo.

2. Réactifs

- Un polysaccharide inconnu
- NaBH_4 dans DMSO (déjà préparé)

Peser 2 g de NaBH_4 (98% Sigma) et porter à 100 ml dans un ballon jaugé avec DMSO (Diméthylsulfoxyde anhydre, Merck Eurolab). Chauffer à 100°C dans un bain-marie et agiter la solution jusqu'à dissolution complète.

- Le standard interne (SI)

Préparer une solution à 10 mg/ml ou 1 mg/ml de 2-déoxyglucose (100 ml), selon les échantillons. Référez-vous au tableau affiché sur la hotte.

- Des standards commerciaux de sucre :

<i>Sucre</i>	Rhamnose	Arabinose	Xylose	Mannose	Glucose	Galactose
<i>formule</i>	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5 \cdot \text{xH}_2\text{O}$	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
<i>MM (g/mole)</i>	182	150	150	180	180	180

- H_2SO_4 1M (déjà préparé)

Diluer 5,5 ml d' H_2SO_4 concentré (18M) dans un ballon jaugé de 100 ml avec de l'eau distillée.

3. Méthode

Remarques :

- 1. Le port du tablier et des lunettes de protection est obligatoire. Tout étudiant pris en défaut se verra sanctionné.**
- 2. Incrire systématiquement sur la verrerie et les vials : N° Echantillon / N° d'équipe.**

A. Réaliser une matière sèche sur chaque échantillon. Pour ce faire, peser exactement environ 2g de matière et les insérer dans une conserve tarée au préalable.

B. Peser environ mais exactement 50 mg de polysaccharide dans un tube Sovirel de 12 ml et ajouter 3 ml de H₂SO₄ 1M tout en agitant au vortex (de manière à ce que la totalité du polysaccharide se trouve en solution).

Rem : Les étapes d'hydrolyse varient d'un échantillon à l'autre. Les points A, B et D ne doivent donc être réalisés qu'après consultation des feuilles affichées sur la hotte.

C. A chaque ajout d'une solution, agiter au vortex. Ne pas oublier de refermer les bouchons sauf pour les étapes 8 et 9. Travailler sous hotte.

D. Placer 1 minute sous azote et hydrolyser à 100°C pendant 3 heures à l'étuve.

E. Refroidir dans la glace puis ajouter doucement du NH₄OH 15M jusqu'à obtenir un pH neutre ou alcalin. Celui-ci peut être estimé à l'aide de papier pH. Lorsque la solution approche de la neutralité, l'ammoniaque doit être ajoutée goutte à goutte à la pipette pasteur.

F. Ajouter exactement 1 ml d'une solution de SI à 1 mg/ml ou 10 mg/ml, selon les cas.

G. Prélever environ 400 µl de cette solution et les placer dans des tubes spéciaux.

H. Ajouter 2 ml de la solution de NaBH₄ dans DMSO, fermer le tube et laisser réagir 90 minutes à 40°C dans un bain marie (plonger le bas du tube juste au dessus du niveau de l'eau. Une pression se développe dans le tube durant la réaction, donc attention à l'ouverture).

I. Ajouter environ 0,6 ml d'acide acétique glacial (bouillonnements et fumées apparaissent).

J. Ajouter environ 0,4 ml de 1-méthylimidazole en environ 4 ml d'anhydride acétique.

L. Après 15 minutes, ajouter environ 10 ml d'eau distillée.

M. Après refroidissement, ajouter environ 3 ml de dichlorométhane (CH₂Cl₂).

N. Récupérer environ 1 ml de la phase inférieure. Injecter en GC ou stocker à -20°C.

4. Analyse

Conditions GC-FID :

- Injection splitless
- Gaz vecteur : hélium
- Gradient de température de 220 à 290 °C
- Colonne apolaire en methyl siloxane
- Détecteur FID

5. Méthode de quantification

La méthode utilisée ici pour le dosage quantitatif des différents sucres est la calibration interne. Elle repose sur l'utilisation du facteur de réponse relatif (fr) de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence. Ceci permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, un handicap de la calibration externe.

La méthode nécessite deux chromatogrammes, l'un pour calculer les facteurs de réponses et l'autre pour l'analyse de l'échantillon. Les aires des pics des produits à quantifier sont donc comparées avec celle d'un composé de référence appelé étalon interne, introduit en masse connue dans l'échantillon.

Etape 1 : préparer une solution de masses connues

Soit les deux produits à doser 1 et 2, de masses connues, auxquels on ajoute un étalon interne E de masse connue. Les facteurs de réponses peuvent être calculés :

$$fr_1 = \frac{M_1 \times A_E}{M_E \times A_1} \text{ et } fr_2 = \frac{M_2 \times A_E}{M_E \times A_2} \text{ , avec M, la masse et A, l'aire du pic.}$$

Etape 2 : Echantillon inconnu auquel on ajoute un standard interne

Soit maintenant une solution contenant les composés 1 et 2 à doser (de masse inconnue) à laquelle on ajoute l'étalon interne E de masse connue. Les masses en 1 et 2 peuvent être déterminées :

$$M_1^* = M'_E \times fr \times \frac{A_1^*}{A_E} \text{ et } M_2^* = M'_E \times fr \times \frac{A_2^*}{A_E}, \text{ avec } M^*, \text{ la masse du composé à doser ;}$$

A^* , l'aire du pic du composé à doser et M'_E , la masse de standard interne dans la solution.

Rem : Le raisonnement à été présenté en termes de masse pour faciliter les calculs de bilans massiques. En réalité, dans la plupart des cas, la concentration est privilégiée dans les formules de calcul en lieu et place de la masse.

6. Résultats

Lors de la formation d'une liaison glycosidique, une molécule d'eau à été éliminée entre les 2 monosaccharides impliqués dans la liaison. Dans un polysaccharide à X liaisons glycosidiques, X molécules d'eau ont donc été éliminées. Ainsi, lors des pesées de standards, X g de monosaccharides commerciaux ne correspondent pas aux mêmes X g de résidus situés dans le polysaccharide de départ. Ce facteur est évidemment à prendre en compte lors de la détermination du pourcentage de saccharides dans un échantillon. Le pourcentage de pureté des standards et la matière sèche de l'échantillon doivent également être intégrés.

Sur base des résultats fournis, il est donc souvent possible de déterminer :

- Le calcul des ratios massiques (ex : 4 g de glucose par g de galactose)
- Le calcul des ratios en nombres de résidus (en utilisant la MM)
- Le pourcentage de polysaccharides dans l'échantillon, par somme des pourcentages de monosaccharides (ex : 80 g de saccharides / 100 g d'échantillon)

TP3 : analyse des lipides

1. Séparation des lipides totaux en classes par chromatographie sur colonne.

1.1. Principe

« Lipide » est le terme générique désignant la matière grasse des êtres vivants. Il ne s'agit pas d'un type de molécule unique mais d'un mélange de molécules dominé par les triglycérides. Outre ces derniers, on retrouve en petites quantités d'autres classes de molécules telles que les phospholipides, les stérols, etc.

Une huile raffinée¹ contiendra majoritairement des triglycérides (figure 2). La proportion d'autres molécules retrouvées dans l'huile donnera donc de précieuses indications quant à la qualité de l'huile. Il est possible de séparer des lipides (ou de l'huile) en différentes fractions en fonction de leurs polarités. La séparation sur colonne est un mécanisme basé sur l'adsorption.

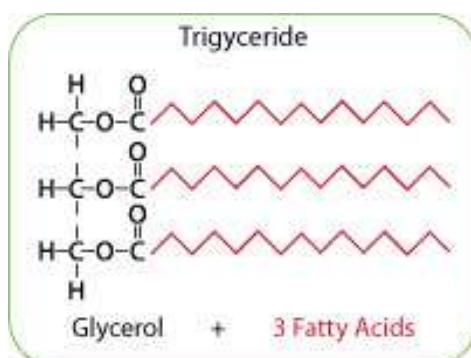


Figure 2 : représentation d'un triglycéride constitué d'un groupement glycérol dont les trois fonctions hydroxyles sont estérifiées par des chaînes d'acides gras.

Les étudiants seront évalués sur la qualité des manipulations, sur la correspondance entre le profil en acide gras obtenu et celui de l'huile d'origine ainsi que sur la qualité du rapport de labo.

1.2. Réactifs

- Solvants : hexane, éther diéthylique, méthanol, chloroforme
- Un échantillon d'huile inconnue

¹ Le raffinage est une étape du procédé d'huilerie qui consiste à purifier l'huile, donc à conserver un maximum de triglycérides et éliminer un maximum d'autres molécules qui pourraient générer un problème de conservation, de goût, etc.

1.3. Préparation de la colonne.

- A. Faire passer 5 ml d'hexane sur la colonne pour la conditionner.
- B. Laisser le niveau d'hexane arriver au niveau du fritté et fermer la pince de Mohr.

1.4. Séparation des différentes fractions

Remarques :

1. **le port du tablier et des lunettes de protection est obligatoire. Tout étudiant pris en défaut se verra sanctionné.**
2. **Inscrire systématiquement sur la verrerie et les vials : N° Echantillon / N° d'équipe.**

C. Tarer les ballons Büchis à la balance de précision (mg)

D. Homogénéiser l'échantillon chauffé à moins de 50°C pour éviter un réarrangement des glycérides partiels.

E. Peser exactement environ 100 mg d'échantillon fondu dans un tube à essai et le diluer dans 0,5 ml d'hexane-chloroforme 3 : 1.

F. Introduire l'échantillon sur le gel de silice à l'aide d'une pipette pasteur, laisser s'écouler le solvant jusqu'au niveau du gel (ne pas laisser aller à sec !) et ajouter délicatement 5 ml d'hexane.

G. Eluer lentement ce solvant.

H. Recueillir l'éluat qui contient la **fraction 1** dans un ballon de 100 ml.

I. Evaporer à sec au rotavapor Büchi puis peser.

J. Quand l'hexane a atteint la surface de la silice, ajouter 10 ml de chloroforme.

K. Récolter la **fraction 2** dans un ballon de 100 ml.

L. Evaporer au Büchi la **fraction 2** et peser.

M. Eluer ensuite de la même manière la **fraction 3** avec 5 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (5 : 2).

N. idem avec la **fraction 4** avec 5 ml de méthanol.

O. Peser chacun des ballons après évaporation et en déduire le bilan massique du fractionnement.

P. Enfin, reprendre chacune de ces fractions respectivement par du CHCl_3 pour les fractions 1-2-3 et du méthanol pour la fraction 4 pour obtenir une concentration finale de 10 mg/ml. Conserver en tube SOVIREL bouché.

Remarques : 1. Si on élue simultanément les fractions 3 et 4 avec du méthanol (5 ml), reprendre le résidu sec avec un mélange EE/MeOH (1 : 1).

2. Un protocole existe également pour des séparations de matière grasse sur colonnes en verre. Il est joint à titre indicatif en annexe 1.

2. Séparation des fractions obtenues par chromatographie sur couche mince

2.1. Principe

Les fractions obtenues (**Q**) vont être à leur tour séparées par CCM et comparées à des témoins. Une CCM simple et une CCM à double élution vont être réalisées sur chacune des 5 (ou 3) fractions obtenues précédemment. La séparation sur couche mince est également basée sur les mécanismes d'adsorption. L'identification des classes de molécules contenues dans chaque fraction se fera par comparaison avec une solution de témoins (figure 4).

Une classe de molécule peut également être déterminée grâce à un paramètre appelé Rf.

$$Rf = \frac{d_R}{d_M} \text{ avec } d_R, \text{ la distance parcourue lors de la migration de la molécule et } d_M, \text{ la distance}$$

parcourue par la migration du solvant.

2.2. Réactifs

- Fractions précédentes
- Solvants : éther de pétrole (60/80) et éther diéthylique
- Acides : formique et acétique
- Témoins CCM
- 2-7 dichlorofluorescéine à 0,2 % dans l'éthanol

2.3. Préparation des témoins

A. Une solution 10 mg/ml de chacun des produits suivants est préparée : hydrocarbure, ester, acide gras libre, triglycéride, stérol, diglycéride, monoglycéride, lipide polaire (déjà préparé).

B. Pour préparer le mélange de témoin, mélanger 0,5 ml de chacune des solutions témoins (**A**) (déjà préparé).

2.4. Dépôt des échantillons

- A. Noter les références des échantillons au crayon.
- B. Appliquer sur chaque plaque, à 1cm du bord inférieur 2 et 4 μl de la solution de M.G. à 10 mg/ml de CHCl_3 , et 2 μl de la solution témoin.
- C. Lors du dépôt, la tache ne doit pas excéder 2 mm. Si le volume est plus important, déposer en plusieurs fois et sécher complètement entre les dépôts.

2.5. Développement des chromatogrammes

- A. La plaque est placée dans une cuve contenant le solvant et le développement commence immédiatement dans le cas où la saturation de la cuve n'est pas nécessaire, (p.ex. pour la séparation d'acides aminés).
- B. En général, la saturation est très importante : la cuve recouverte du couvercle est inclinée de telle façon que le solvant n'atteigne pas le bas de la plaque à développer. On laisse ainsi l'atmosphère se saturer en vapeurs de solvant. Cette saturation est améliorée et accélérée en tapissant une des parois de la cuve d'une feuille de papier filtre plongeant dans le solvant ou en agitant fortement la cuve avant d'y introduire la couche mince.
- C. Après 10', la cuve est redressée doucement, et le solvant venant en contact avec l'adsorbant, le développement commence.
- D. Il est arrêté lorsque le solvant atteint la partie supérieure de la CCM.
- E. Lorsque le développement est terminé, on retire la plaque de la cuve avec précaution et on la laisse sécher à l'air (**sous hotte**), après avoir indiqué le niveau du solvant.
- F. Pour les CCM à double élution : après la première élution, sortir la couche mince et la laisser sécher. Eluer ensuite une seconde fois dans le même solvant.

2.6. Préparation des solvants d'élution

La composition des solvants CCM est donnée à la figure 3 ci-dessous.

Figure 3

CCM	composition	volume
Solvant I	Ether de pétrole (60/80) (EP)	9 ml
	Ether diéthylique (EE)	1 ml
	Acide acétique (Hac)	0,1 ml
Solvant II	Ether de pétrole (60/80) (EP)	6 ml
	<u>double</u> Ether diéthylique (EE)	4 ml
	<u>élution</u> Acide formique (HFo)	0,15 ml

Figure 3 : composition en volume des solvants pour CCM simple et CCM à double élution.

Figure 4 : représentation schématique de l'élution de la solution de témoins en CCM simple et à double élution. Avec : Hy = hydrocarbures, es = esters, tri = triglycérides, di = diglycérides, mo = monoglycérides, ac = acides gras, st = stérols, po = lipides polaires

Figure 4

CCM de silicagel	
EP / EE / Hac 9 / 1 / 0,1	Double élution EP / EE / HFo 6 / 4 / 0,15
Lipides	Lipides
○ hy	○ tri
○ es	○ ac
○ tri	○ di 1/3
○ ac	○ st
○ st	○ di 1/2
○ di	○ mo
○ mo + po	○ po

2.7. Révélation des lipides

- Après séchage des plaques, les vaporiser avec une solution de 2-7 dichlorofluorescéine à 0,2 % dans l'éthanol.
- Observer la coloration sous une lampe U.V. (2537 Å).
- Entourer les tâches colorées au moyen d'un crayon gras.
- Calculer le Rf des différents composants du témoin, et en déduire la composition de la M.G.

Rem 1 : la fluorescéine se fixe sur les produits organiques d'autant plus qu'ils sont insaturés. Sous UV, on observera donc des spots fluorescents là où se trouvent les molécules à identifier. Il s'agit d'une détection qualitative.

Rem 2 : Il est également possible de séparer les triglycérides par CCM selon leur nombre de doubles liaisons. Pour se faire, la couche mince doit préalablement être imprégnée d'AgNO₃ 6%. Ensuite, les triglycérides sont séparés à l'abri de la lumière sur la CCM activée par le mélange : benzène – éther de pétrole – éther diéthylique 9 : 1 : 0,2 V/V. Plus une molécule d'ester présente d'électrons π, plus grande sera sa rétention sur la phase stationnaire.

3. Détermination de la composition en acides gras

3.1. Principe

Il est possible de retrouver l'origine d'une huile inconnue sur base de son profil en acides gras. En effet, selon l'origine végétale de l'huile, la composition en acide gras va varier (annexe 2).

La composition en acides gras de la matière grasse est déterminée par GC des esters méthyliques des acides gras méthanolysés par un mélange *BF3-méthanol*. Les esters ainsi formés (figure 5) sont analysés par GC sur colonne d'*éthylène glycol adipate* stabilisé (EGA).

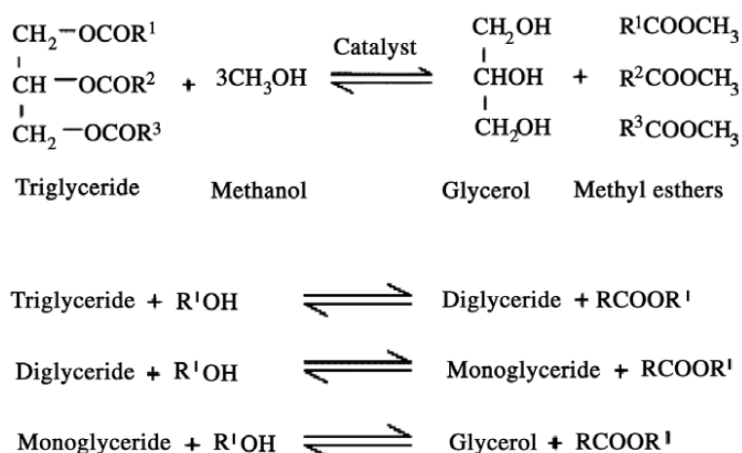


Figure 5 : Transestérification des triglycérides : ils sont transformés en esters méthyliques d'acides gras pour les rendre volatils.

3.2. Réactifs

- Un échantillon d'huile inconnue (le même qu'au point 1.2)
- Réactif au BF₃ (méthanol-BF₃ 14% - hexane (55:25:20))
- Solution saturée en NaCl
- Acide sulfurique 10%
- Hexane

3.3. Transestérification au BF₃-méthanol

A. Dans un tube Sovirel (utiliser du matériel bien sec), mettre 10 mg d'huile bien au fond du tube, 0,2 ml d'*hexane* et 0,5 ml de réactif au *BF₃* (*méthanol-BF₃* 14% - *hexane* (55:25:20), déjà préparé).

B. Placer le tube hermétiquement fermé 1h30 dans un bain-marie à 70°C.

Rem : si le niveau a baissé après 15 minutes, recommencer.

3.4. Extraction des esters méthyliques

A. Après la transestérification, laisser refroidir à température ambiante.

B. Ajouter ensuite 0,5 ml d'une solution saturée en *NaCl* (déjà préparée)

C. Ajouter 0,2 ml de *H₂SO₄* à 10 %, bien agiter

D. Ajouter 9 ml d'*hexane*, agiter vigoureusement le tube et prélever dans la couche supérieure pour injecter dans le chromatographe (0,5 µl de la phase supérieure).

Rem : Si la M.G. contient des acides gras inférieur à C6, le pentane remplace l'hexane.

3.5. Analyse

L'appareil et les conditions opératoires seront présentés au TP.

3.6. Résultats

Il ne s'agit pas ici, à proprement parler, d'un dosage car on ne recherche pas la concentration en acides gras d'un échantillon. En effet, l'objectif de l'analyse est de déterminer le profil en acides gras d'une huile pour retrouver son origine. Pour définir ce profil, il suffit de rapporter l'aire du pic de chaque acide gras sur l'aire totale des pics de l'échantillon.

4 : Annexe 1

1.3. Préparation de la colonne.

- A.** Sécher 40 gr de silicagel à 200° (70-230 mesh) pendant au moins 2 h jusqu'à poids constant.
- B.** Peser le silicagel sec.
- C.** Ajouter alors la quantité d'eau nécessaire pour obtenir un silicagel à 5% d'humidité (environ 1,7g).
- D.** Agiter pendant 1h pour répartir l'eau de façon homogène (Büchi rotavapor).
- E.** Introduire 35 gr de silicagel dans un bécher de 150 ml.
- F.** Ajouter 100 ml d'hexane-éther diéthylique 90/10 et agiter lentement avec un agitateur pour éliminer complètement l'air.
- G.** Introduire la bouillie ainsi formée dans la colonne, s'aider du même solvant pour transvaser quantitativement les 35 gr.
- H.** Laisser l'hexane-éther diéthylique 90/10 s'écouler jusqu'à ce que le niveau arrive à 2 cm au-dessus de la silice.

1.4. Séparation des différentes fractions

- A.** Homogénéiser l'échantillon chauffé à moins de 50°C pour éviter un réarrangement des glycérides partiels.
- B.** Peser exactement 0,60 à 0,65 gr d'échantillon fondu dans un tube à essai et le diluer dans 0,5 ml d'hexane-éther diéthylique 90/10.
- C.** Laisser l'hexane-éther s'écouler jusqu'au niveau du gel. Introduire l'échantillon sur le gel de silice à l'aide d'une pipette pasteur sans perturber la surface du gel, laisser s'écouler le solvant jusqu'au niveau du gel (ne pas laisser aller à sec !) et ajouter délicatement 5 ml de mélange d'hexane-éther diéthylique 90/10.
- D.** Eluer lentement ce solvant.
- E.** Lorsque le niveau du solvant arrive à 2 cm au-dessus du niveau du silicagel, connecter l'ampoule à la colonne.
- F.** Verser dans l'ampoule 65 ml de mélange hexane-éther diéthylique 90/10.
- G.** Laisser couler l'hexane-éther diéthylique 90/10 à la vitesse de 2 ml/min environ, qui doit être également la vitesse d'écoulement de l'éluat en bas de la colonne.

Rem : pour la suite, n'oubliez pas de tarer les ballons buchis à la balance de précision (mg).

H. Recueillir l'éluat qui contient la **fraction 1** (Hx/EE 90:10) dans un erlen de 150 ml puis filtrer dans un ballon **Büchi taré** à la balance de précision.

I. Evaporer à sec au rotavapor Büchi puis peser.

J. Quand tout le mélange hexane-éther diéthylique 90/10 a été introduit dans la colonne et que son niveau atteint la surface de la silice, ajouter 5 ml d'hexane-éther diéthylique 80/20.

K. Mettre 125 ml du même mélange dans l'ampoule.

L. Laisser couler comme précédemment et recueillir l'éluat qui contient la **fraction 2** (Hx/EE 80:20) dans un erlen de 150 ml puis filtrer dans un ballon Büchi taré.

M. Evaporer au Büchi la **fraction 2** et peser.

N. Eluer ensuite de la même manière la **fraction 3** avec 5 + 95 ml d'un mélange hexane-éther diéthylique 70/30,

O. idem avec la **fraction 4** avec 5 + 95 ml d'éther diéthylique,

P. idem avec la **fraction 5** avec 5 + 95 ml de méthanol.

Q. Après élimination du solvant, reprendre chacune de ces fractions respectivement par du CHCl_3 pour les fractions 1-2-3-4 et du méthanol pour la fraction 5 pour obtenir une concentration finale de 10 mg/ml. Conserver en tube SOVIREL bouché.

Remarque.

Si on élue simultanément les fractions 3 à 5 avec du méthanol (5 + 95 ml), reprendre le résidu sec avec un mélange *EE/MeOH* (1 : 1).

TP4 : Dosage des sucres par colorimétrie

1. Dosage des sucres – méthode phénol-acide sulfurique

1.1. Principe

Le phénol en présence d'acide sulfurique peut être utilisé pour le dosage quantitatif des sucres et leurs dérivés méthylés, des oligosaccharides et des polysaccharides. C'est une méthode colorimétrique proposée par DUBOIS *et al.*, [1956] (annexe 3).

Un dosage colorimétrique est possible lorsqu'une réaction chimique donne des produits colorés et que l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser.

Les dosages colorimétriques s'appuient sur la loi de Beer – Lambert qui définit la transmittance (T) d'une solution comme étant la fraction de l'intensité lumineuse la traversant (figure 6) : $T = I_0/I_T$. La transmittance varie en fonction de la longueur d'onde choisie au photospectromètre.

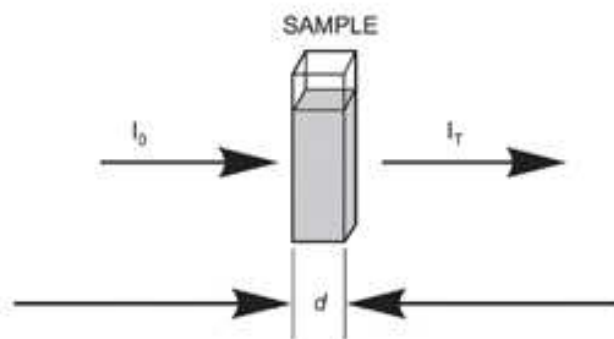


Figure 6 : représentation d'une cuvette photospectrométrique et des rayonnements incidents et transmis.

La loi de Beer – Lambert est généralement exprimée en fonction de l'absorbance (A), appelée également densité optique (DO) : $A = \epsilon \cdot d \cdot C$ avec ϵ , le coefficient d'extinction moléculaire ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ; d, la longueur parcourue par le rayonnement lumineux, c'est-à-dire la longueur de la cuve (cm) et C, la concentration de la solution (mol.l^{-1}). Absorbance et transmittance sont reliées par la relation suivante : $A = \log (1/T)$.

Les conditions qui doivent impérativement être remplies pour réaliser un dosage colorimétrique sont les suivantes :

- la réaction doit donner une coloration proportionnelle à la concentration
- la coloration doit être stable dans le temps
- le composé à analyser doit être présent en faible concentration dans la solution
- la longueur d'onde du photospectromètre doit être celle qui permet la plus forte absorbance possible

La séance sera consacrée au dosage d'un sucre contenu dans une mélasse ou un soda par cette méthode. La mélasse est un sirop très épais et très visqueux qui est un résidu du raffinage du sucre.

Les étudiants seront évalués sur le dosage du sucre et la qualité du rapport de labo.

1.2. Réactifs

- *Acide sulfurique* 95% massique de densité 1,84 (déjà préparé)
- *Phénol* 80% massique préparé en ajoutant 20 g d'*eau distillée* glacée à 80 g de *phénol* (déjà préparé)

1.3. Protocole

Remarques :

- 1. le port du tablier et des lunettes de protection est obligatoire. Tout étudiant pris en défaut se verra sanctionné.**
- 2. Inscrire systématiquement sur la verrerie et les vials : N° Echantillon / N° d'équipe.**
- 3. Soyez attentifs aux unités des concentrations.**

A. Diluer l'échantillon de manière à se situer dans les conditions du point B. Référez vous au tableau affiché sur la hotte.

B. 2 ml de solution sucrée obtenue précédemment, contenant entre 10 et 70 µg de sucre, est pipetée et placée dans un tube à essais

C. 0,05 ml de *phénol* à 80% sont ajoutés

D. 5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés rapidement et de manière à ce que le mélange soit homogène

E. Les tubes sont laissés au repos 10 minutes, puis agités et placés pendant 10 à 20 minutes à une température de 30°C

F. Une partie de la solution contenue dans les tubes à essais est prélevée afin de remplir la cuvette photospectrométrique aux trois quarts.

G. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 490 nm

1.4. Elaboration de la courbe d'étalonnage

La teneur en hexose est exprimée par rapport à une droite étalon élaborée à partir du même sucre. Cette courbe représente les absorbances en fonction de la concentration croissante en sucre en μg .

A. Préparer une solution 1/1000 en sucre, soit 1 g/l

B. Réaliser la courbe de calibrage contenant de 0 à 100 μg d'hexose selon le protocole 1.3.

C. Tracer la courbe

1.5. Résultats

La teneur en hexoses du soda est obtenue en insérant l'absorbance de l'échantillon inconnu dans l'équation de la droite trouvée à partir de la courbe d'étalonnage (Explications données au TP).

2. Visite du CBI

ANNEXES

Annexe 1 : ratio de différents polysaccharides.

Annexe 2 : profil en acide gras de différentes huiles commerciales.

Huiles	Nombre atomes carbone														% insaponifiable
	<12	C12	C14	C16	C16 1//	C18	C18 1//	C18 2//	C18 3//	C20	C20 1//	C22	C22 1//	C24	
Amandes			0,05	6,78	0,33	1,58	67,3	22,9	0,08	0,07	0,07	0,17			0,5
Arachide Afrique			trace	10,27	0,07	3,74	56,64	21,13	0,03	1,68	1,22	3,1	0,05	1,47	0,6 à 1
Arachide Amérique du Sud			trace	11,24	trace	3,28	38,67	37,90	0,11	1,67	1,32	3,88	trace	1,59	0,6 à 1
Arachide Chine			0,01	11	0,01	3,5	41,1	36,14	0,02	1,7	1,15	3,45	0,02	3,9	
Arachide U.S.A.			0,04	10,6	0,13	2,41	47,05	30,27	0,14	1,31	1,60	3,55	0,15	1,90	0,6 à 1
Colza ancien				3,28	0,2	1,05	12,7	13,47	7,96	0,64	9,4		50,57		
Colza nouveau (ou « Canola »)				5,56	0,12	1,38	58,25	22,17	8,9	0,22	1,83	0,125	1,20		1,2
Coprah	15,45	47,49	17,3	8,56		2,64	6,49	1,56							0,2-0,4
Coton			0,8-1,2	17,1-24,8		0,9-2,7	18-44	34-55	0,1-2,1		0,1				
Germe de blé				20	0,3	0,3	16,7	56,0	5,0		2,0				
Germe de maïs				10,69	0,12	2,00	25,46	59,35	0,92	0,37	0,32		0,52		0,2-2
Noisette			0,05	5,61	0,13	1,61	75,74	16,13	0,23	0,11	0,18	0,16			0,3 - 0,7
Noix			trace	7,65	0,15	1,85	14,15	61,3	14,7	0,2					1,33
Olive vierge				14,39	1,65	2,48	66,68	13,91	0,5						1,2
Palme (espèce Elais guineensis)		0,04	0,89	43,14	0,18	5,41	38,72	10,59	0,27	0,39	0,08				0,35
Palme (espèce mélanococca)		0,5	0,5	20,0	1,5	0,7	57,3	13,6	0,9						0,35
Palmiste (espèce Elais guineensis)	7,05	40,36	19,42	8,31		2,08	19,53	2,71							0,35
Pépins de raisins			0,06	7,1	0,44	5,1	15,84	70,62	0,26	0,26	0,1	0,22			0,8-1,5
Pépins de tomates			0,1	14,03	0,49	5,55	21,92	54,31	2,09	0,55					
Sésame				9,2	0,2	5,4	39,6	44,1	0,4	0,7	0,3				1-1,5
Soja				11,03		3,91	23,04	56,84	7,9	trace	trace	trace			1,8 (brut)
Tournesol France				6,27		4,86	19,59	67,44	0,03	0,31	0,13	0,85			0,5 à 1,5

Annexe 3 : méthode colorimétrique de dosage des sucres.