

D. FRONTIER-ABOU

**TECHNIQUES D'ETUDE D'ORGANISMES MARINS
ET DE FARINES DE POISSONS :**
composition globale et lipides



OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

DOCUMENTS SCIENTIFIQUES DU CENTRE DE NOSY-BÉ

Document n 13



décembre 1972

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE DE NOSY-BE MADAGASCAR

TECHNIQUES D'ETUDE D'ORGANISMES MARINS

ET DE FARINES DE POISSONS :

composition globale et lipides

par

D. FRONTIER-ABOU (*)

Document n° 13 : décembre 1972

(*) Nutritionniste, Centre ORSTOM ~~de Nosy-Bé~~. B.P. 68, Nosy-Bé, Madagascar.

TECHNIQUES D'ETUDE D'ORGANISMES MARINS ET DE FARINES DE POISSONS :
composition globale et lipides.

par Danièle FRONTIER-ABOU (1)

RESUME

1ère partie : Description détaillée de techniques simples permettant d'évaluer la valeur alimentaire d'après les principales caractéristiques de la composition chimique : teneurs en eau, lipides, azote et protéines brutes, chitine, minéraux totaux et parmi ces derniers : teneurs en silice, calcium, phosphore et chlorure de sodium.

2ème partie : Description détaillée des techniques d'étude des lipides aboutissant à la préparation de solutions de méthylesters d'acides gras destinés à être ultérieurement étudiés par chromatographie en phase gazeuse : principalement extraction de lipides totaux, séparation en classes de lipides, saponification et méthylation.

(1) Nutritionniste, Centre ORSTOM, B.P. 68, Nosy-Bé, Madagascar.

INTRODUCTION.

Le travail du laboratoire de Nutrition porte sur trois sujets principaux :

- La composition globale d'organes de poissons et ses variations
- La valeur alimentaire de farines de poissons et de poissons séchés de façon traditionnelle
- La nature des acides gras des lipides d'organismes marins.

Certaines des techniques qui doivent être mises en oeuvre pour ces études n'ont pas pu l'être à Nosy-Bé, en raison de l'équipement spécialisé qu'elles nécessitent.

Des dosages ont donc été exécutés dans d'autres laboratoires: dosage microbiologique de vitamines, identification et dosage d'acides aminés par chromatographie sur colonne, dosage d'éléments minéraux par spectrophotométrie de flamme, dosage d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Nous nous bornons, dans ce fascicule à exposer les techniques pratiquées le plus couramment à Nosy-Bé, qui ne demandent qu'un équipement modeste.

Elles aboutissent d'une part à la connaissance de la composition chimique globale d'un échantillon, et d'autre part à la préparation de méthylesters d'acides gras destinés à être analysés par chromatographie en phase gazeuse. Toutes ces techniques sont fondées sur des principes simples. Cependant leur mise en oeuvre correcte demande le respect de nombreux points de détail. C'est pourquoi nous exposons minutieusement le déroulement des manipulations afin qu'elles puissent être comprises et au besoin reproduites avec le maximum de sûreté.

PLAN.

I. COMPOSITION GLOBALE.

Organigramme	6
1.1. Dosage de l'eau et du poids sec	7
1.2. Dosage des lipides totaux	7
12.1. Hydrolyse préalable	8
12.2. Extraction de Soxhlet	9
- Solution de HCl 6,73 N	12
1.3. Dosage d'azote et de protéines	12
- Solution borique	19
- Solution d'alcool à 50°	21
- Solution de bleu de méthylène	21
- Solution de rouge de méthyle	21
- Réactif de Tashiro	22
- Lessive de soude	23
- Solution de phénol-phtaléine	23
- Solution de SO_4H_2 N/50	24
- Solution de SO_4H_2 N/20	25
1.4. Dosage de minéraux	25
14.1. Dosage des minéraux totaux	25
14.2. Dosage de silice	26
- HCl environ 0,5 N	28
- HCl 0,01 N	29
14.3. Dosage de calcium	29
- Solution saturée d'acide oxalique	31
- Solution concentrée de chlorure de calcium	32
14.4. Dosage du phosphore	32
- Acide nitrique 0,5 N environ	36
- Acide nitrique 0,01 N	36
- Rinçage nitrique	36
- Réactif nitromolybdique	37
- Rinçage nitromolybdique	38
14.5. Dosage du chlorure de sodium	38
- Solution saturée d'alun de Fe et Am	41
- Nitrate d'argent N/10	42
- Titrage volumétrique du nitrate d'argent N/10	43
- Solution de chromate de potassium 1/10	43
- Solution de sulfocyanure de potassium N/10	44
- Titrage volumétrique d'une solution de sul- focyanure de potassium	45
1.5. Dosage de chitine	46
- Solution de SO_4H_2 1,25 %	50
- Solution de NaOH 2,50 %	51
- Solution de Bleu de bromothymol	51

- Mélange méthylal-méthanol 52

II. ETUDE DES LIPIDES.

Organigramme 53

2.1. Extraction à froid des lipides totaux..... 54

- Distillation de solvants 56
- Evaporation de solvants à l'évaporateur rotatif..... 58
- Préparation d'un filtre amiante sable 60
- Solution de HCl environ 4 N 62
- Test au toluène 64

2.2. Saponification à chaud des lipides totaux 64

- Solution de KOH environ 2 N dans le méthanol.. 66

2.3. Acidification et extraction des acides gras..... 66

2.4. Méthylation des acides gras 68

2.5. Extraction des méthylesters 69

2.6. Conservation des méthylesters en ampoules scellées 71

2.7. Séparation des lipides en classes 72

2.8. Séparation des glycérides et des acides gras libres 76

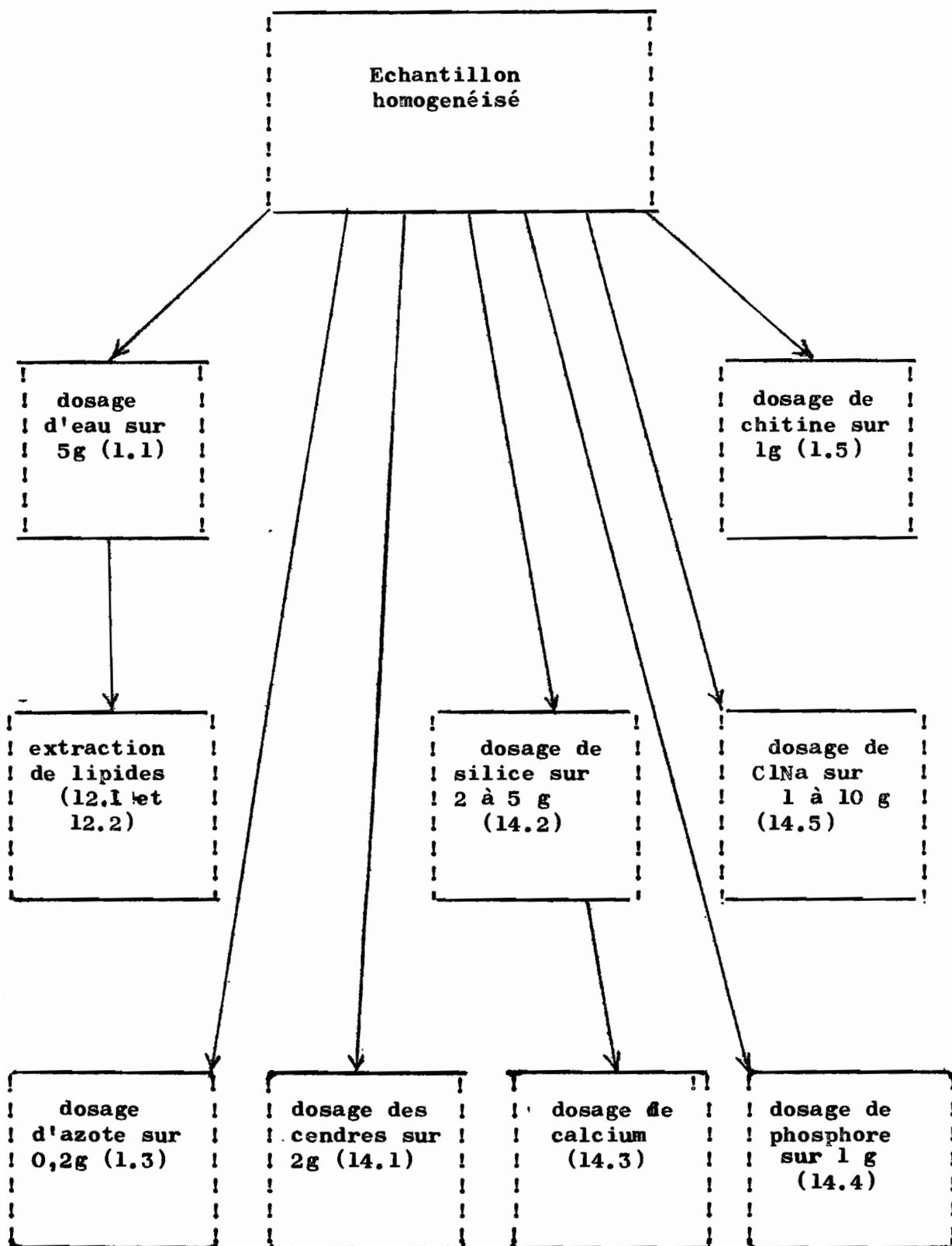
- Solution de KOH environ N/10 dans le mélange méthanol-eau 78
- Solution de KOH environ N/100 dans le mélange méthanol-eau 79

2.9. Manipulation à faire subir aux quatre fractions lipidiques issues de la chromatographie sur colonne et la séparation entre glycérides et acides gras 79

- a) cholestérides et phospholipides 79
- b) glycérides 80
- c) savons des acides gras libres 80
- Mélange sulfochromique 81

Bibliographie 82

COMPOSITION GLOBALE.



I. COMPOSITION GLOBALE.

1.1. DOSAGE DE L'EAU ET DU POIDS SEC.

Principe. L'eau est la principale substance qui s'évapore lorsqu'on fait dessécher un échantillon de faible masse (jusqu'à 10 g) dans une étuve à circulation d'air, réglée entre 100 et 105°C, jusqu'à poids constant.

Matériel : un petit cristalliseur en verre pyrex dont le numéro est gravé, de 35 mm de diamètre et 2 mm de hauteur - une étuve à circulation d'air réglable - une balance de précision (type Mettler) dont la précision atteint 5/100e de mg - un dessiccateur.

Mode opératoire :

- on lave le cristalliseur, on le sèche à l'étuve, on le garde au moins 3 heures dans un dessiccateur pour que sa température s'équilibre avec celle du laboratoire
- on pèse le cristalliseur vide puis le cristalliseur contenant environ 5 g de substance broyée (pesée le plus exactement possible)
- on fait sécher dans l'étuve jusqu'à poids constant. (L'expérience montre qu'une durée de 14 heures est suffisante, le séchage peut ainsi se faire la nuit)
- on met le cristalliseur contenant l'échantillon sec dans un dessiccateur et on l'y maintient au moins 3 heures
- on pèse le cristalliseur avec l'échantillon sec.

Calculs : - on calcule le poids de l'échantillon frais initial, le poids de l'eau évaporée, le pourcentage d'eau par rapport à la substance initiale et le pourcentage du poids sec.

Exemple :

Pourcentage d'eau et de matière sèche contenus dans la partie comestible d'un échantillon de crevettes Metapeneus monoceros :

poids du cristalliseur vide : 14,20800 g
poids du cristalliseur + échantillon frais : 19,78410 g
poids du cristalliseur + échantillon après séchage : 15,57610 g
poids de l'échantillon : 19,78410 g - 14,20800 g = 5,57610 g
poids de l'eau évaporée : 19,78410 g - 15,57610 g = 4,20800 g

pourcentage d'eau :

$$\frac{4,20800 \times 100}{19,78410} = 75,46 \%$$

pourcentage du poids sec : 100 % - 75,46 % = 24,54 %

1.2. DOSAGE DES LIPIDES TOTAUX.

Le dosage se fait sur le résidu sec du dosage de l'eau.

Pour les échantillons d'organes de poissons et de farines de poissons, nous préférons faire précéder l'extraction lipidique d'une hydrolyse acide, ce qui permet de séparer les lipides plus aisément en rompant les éventuelles liaisons entre lipides et protéines.

12.1. Hydrolyse préalable.

Principe. L'hydrolyse se fait en milieu chlorhydrique, à chaud, pendant 6 heures à 90°C

Matériel par échantillon :

- deux erlenmeyers de 200 ml - un entonnoir pyrex, diamètre d'ouverture 90 mm - deux filtres ronds "sans graisse" (marque DURIEUX, qualité sans cendres, lavés aux acides chlorhydrique et fluorhydrique, qualité sans graisse, diamètre 15 cm, filtration normale).

Remarque : avant usage, les deux filtres ont été pliés ensemble, redégraissés au laboratoire pendant deux heures (voir 12.2), l'expérience montrant que le faible résidu graisseux des filtres "sans graisses" suffit à fausser les dosages pour les petites quantités.

- un bain-marie à eau - un réfrigérant à air constitué d'un tube de verre de 1 m. de long monté sur le bouchon en caoutchouc de l'erien - un thermomètre - deux verres de montre de 50 mm de diamètre pour servir de couvercle aux cristallisoirs et aux erlens - une pissette à eau distillée ou déminéralisée, en plastique - un ballon de 1 litre en pyrex à long col entouré de ficelle d'amiante - un dispositif pour tenir à la verticale les cannes de verre - une étuve à circulation d'air - une éprouvette de 20 ml - un petit agitateur en verre - une pipette de 2 ml.

Produits chimiques :

- terre d'infusoire - HCl à 6,73 N - eau distillée ou déminéralisée bouillante - alcool éthylique à 95° - papier pH (de 1 à 10).

Mode opératoire :

- verser l'échantillon desséché du petit cristallisoir dans un erlen portant le même numéro (au crayon)
- ajouter 20 ml d'acide HCl 6,73 N et 2 ml d'alcool pour submerger l'échantillon, on recouvre d'un verre de montre
- dans le cristallisoir qui contient encore quelques débris antérieurs, on verse de l'HCl et de l'alcool, on recouvre également d'un verre de montre
- on laisse la substance s'imprégner du mélange à froid pendant une nuit
- puis on verse intégralement le contenu du cristallisoir dans l'erien en s'aidant d'un agitateur en verre

- ajuster le bouchon muni de son tube de verre (réfrigérant à air) sur l'erlen
 - placer l'erlen dans le bain-marie à 90°C et l'y laisser pendant 5 heures
 - pendant ce temps, la substance en suspension dans l'acide chlorhydrique chaud devient noire et pulvérulente. (Ce broyage chimique libère les lipides qui étaient éventuellement liés aux protéines). Quand l'hydrolyse est terminée on prépare de l'eau distillée ou déminéralisée bouillante
 - on numérote (même numéro que le cristallisateur) au crayon l'un des deux filtres dégraissés plissés. On le place dans l'entonnoir au-dessus de l'erlen vide
 - rajouter une grosse spatulée de terre d'infusoire (environ 2 à 3g). On agite et on verse avec précaution l'ensemble sur le filtre
 - rincer abondamment à l'eau bouillante avec la pissette en plastique, jusqu'à ce que le liquide de rinçage ne montre plus d'acidité (pH = 7) (le jet d'eau ne doit pas être trop violent afin de ne pas percer les filtres)
La substance hydrolysée contenant les lipides reste au-dessus de l'entonnoir. L'eau et l'acide tombent dans l'erlen.
 - on laisse égoutter le filtre chargé au moins 30 minutes
 - caler le filtre sur un petit cristallisateur
 - placer l'ensemble dans une étuve à circulation d'air réglée à 40°C pour une nuit (une dessiccation à forte température rend le papier filtre cassant et difficile à manipuler ultérieurement)
 - quand le séchage est fini, on ajoute dessous un 2ème filtre dégraissé numéroté et on ferme l'ensemble avec des agrafes.
- On dispose ainsi de deux papiers filtres numérotés contenant le résidu sec du dosage d'eau, après hydrolyse, rinçage et séchage.

12.2. Extraction de Soxhlet.

Principe. La substance est lavée jusqu'à épuisement avec de l'éther éthylique qui entraîne les lipides. L'appareil de Soxhlet permet ces lavages successifs avec une quantité minimale d'éther (dans ce cas 100 à 120 ml). L'éther ayant servi à une extraction est automatiquement purifié par distillation et réutilisé pour le lavage suivant en raison de la conformation de l'appareil.

Matériel : un appareil de Soxhlet pour ballons de 100 ml - un ballon pyrex de 100 ml, dont le numéro est gravé, préalablement lavé, séché à l'étuve et conservé dans un dessiccateur - un chauffe ballon à rhéostat - une étuve à circulation d'air à T° réglable - un dessiccateur - une balance de précision - une éprouvette de 100 ml - un courant d'eau froide - un support, des pinces et des noix pour maintenir l'appareil.

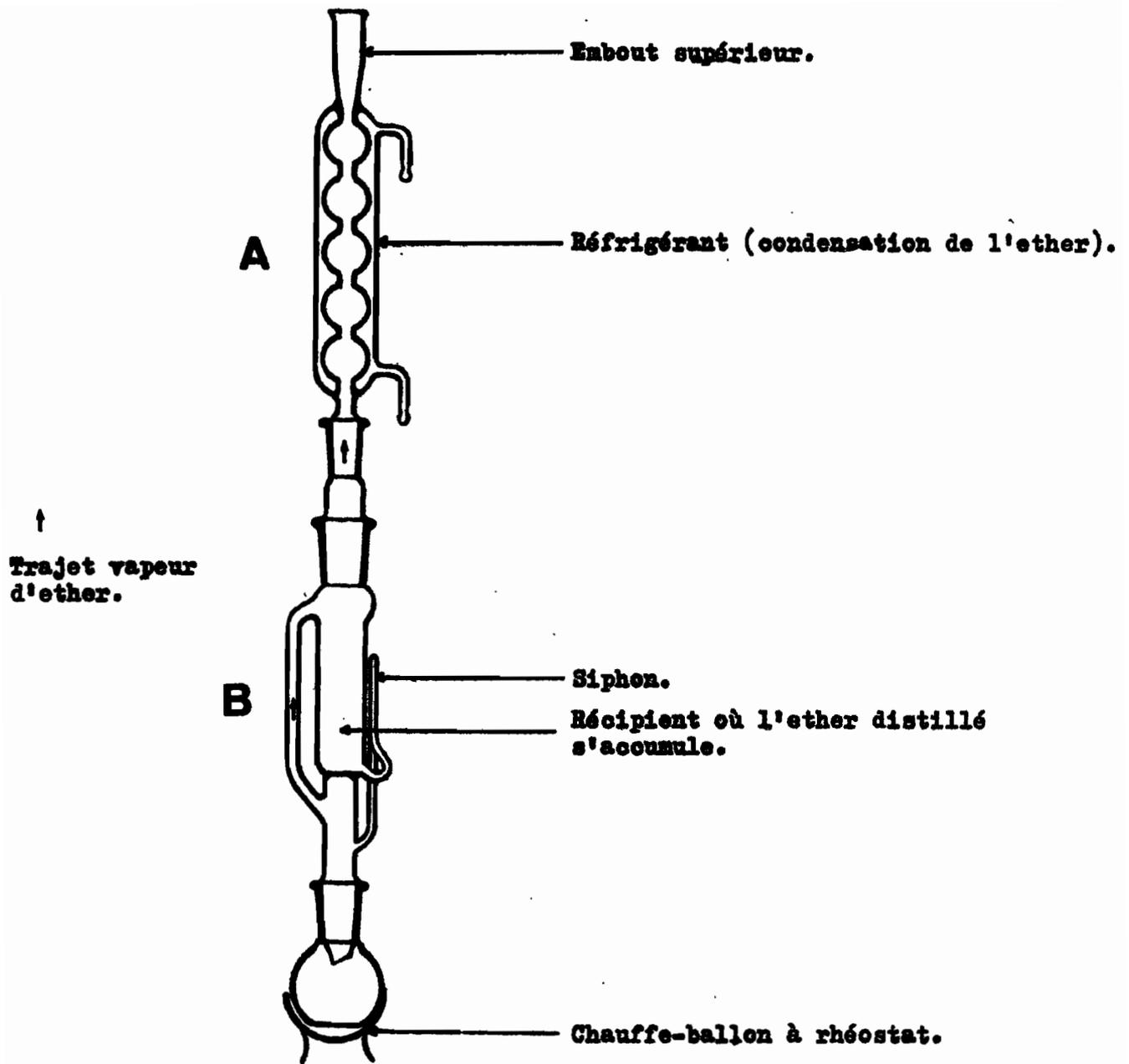


Fig. 1 - Schéma d'un appareil de SOXHLET.

Produits chimiques : - éther éthylique R.P.

Mode opératoire :

- on démonte l'appareil de Soxhlet pour libérer la partie B.
- on place dans le récipient de distillation l'échantillon à extraire contenu dans les papiers filtres
- on remet en place la partie B
- on retire le ballon propre du dessiccateur et on le pèse immédiatement
- on note le numéro de l'échantillon à analyser et le numéro du ballon correspondant
- on verse par l'embout supérieur de l'appareil 100 ml d'éther éthylique (éprouvette)
- on ajuste ballon, chauffe-ballon et partie B
- on fait circuler l'eau dans le réfrigérant
- on chauffe doucement (rhéostat) pour distiller l'éther pendant 6 heures, en surveillant que le ballon contient toujours un peu d'éther, même quand le récipient supérieur de récolte est plein
- en cas de besoin, sans démonter l'appareil, on peut ajouter 20 ml d'éther par l'embout supérieur
- au bout de 6 heures, tous les lipides qui étaient dans l'échantillon sont passés dans le ballon
- on démonte l'appareil pour libérer la partie B
- on remonte l'appareil et on continue la distillation en la surveillant attentivement; il faut que l'éther s'évapore du ballon sans que les lipides soient surchauffés
- lorsqu'il apparaît que tout l'éther semble évaporé, on libère le ballon
- on le place une heure dans l'étuve à 100-105°C, pour chasser le résidu d'éther dilué dans les lipides
- au sortir de l'étuve, on place le ballon dans le dessiccateur
- on laisse équilibrer les températures (3 heures au minimum)
- on pèse le ballon contenant des lipides
- un deuxième séchage suivi d'une deuxième pesée permettra de contrôler si un résidu d'éther était resté mêlé aux lipides

Calculs :- on a le poids de l'échantillon frais initial, le poids du ballon vide, le poids du ballon contenant les lipides.

on en déduit :

le poids des lipides contenus dans l'échantillon et leur pourcentage.

Exemple :

Pourcentage des lipides dans un échantillon de crevettes Metapeneus monoceros :

poids du ballon vide : 47,51675 g
poids du ballon contenant les lipides : 47,60720 g
poids de l'échantillon initial : 5,57610 g
poids des lipides : 47,60720g - 47,51675g = 0,09045 g
pourcentage des lipides :

$$\frac{0,09045 \times 100}{5,57610} = 1,62 \%$$

SOLUTION DE HCl 6,73 N.

Matériel : une bouteille de 1 litre avec bouchon de plastique - une éprouvette de 1000 ml - une éprouvette de 100 ml - une fiole jaugée de 1 litre munie d'un bouchon de verre - un entonnoir.

Produits chimiques :

HCl R.P. d = 1,18 (normalité : 12 N) - eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- dans l'éprouvette de 1000 ml, verser avec précaution 561 ml de HCl R.P.
- dans la fiole jaugée verser environ 400 ml d'eau déminéralisée ou distillée
- à l'aide de l'entonnoir verser, très progressivement et en agitant avec précaution, dans la fiole jaugée l'acide chlorhydrique de l'éprouvette. (le mélange s'échauffe)
- boucher la fiole et la laisser refroidir
- ajuster au trait de jauge avec de l'eau
- verser dans la bouteille.

Utilisation : sert pour l'hydrolyse des substances, avant l'extraction des lipides.

Calcul de la normalité :

1000 ml de HCl R.P. correspondent à 12 normalités
561 ml de HCl R.P. étendus à 1 litre correspondent à :

$$\frac{12 \times 561}{1000} = 6,73 \text{ N}$$

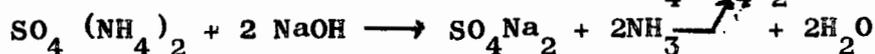
1.3. DOSAGE D'AZOTE (DOSAGE DE KJELDAHL) ET DE PROTEINES.

Principe : L'échantillon est chauffé avec de l'acide sulfurique pur bouillant, en présence d'un catalyseur, c'est la minéralisation. L'azote de l'échantillon se combine à l'acide sulfurique et donne $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ stable, en solution dans l'acide sulfurique.

Ensuite on fait agir la soude en excès qui va à la fois .. neutraliser l'acide sulfurique restant :



.. déplacer l'ammonium de la molécule de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$:



Il y a une libération de gaz ammoniac.

- le gaz ammoniac est entraîné par un courant de vapeur d'eau bouillante, puis on condense le tout par réfrigération sous forme de NH_4OH (ammoniaque) et de H_2O liquides
- l'ammoniaque est capturé dans une solution d'acide borique Cet ammoniaque contient tout l'azote initial de l'échantillon (sauf quelques rares exceptions, par exemple, l'azote de la chitine), c'est pourquoi on l'appelle azote "total".
- pour le dosage, on neutralise l'ammoniaque par une solution titrée d'acide sulfurique ce qui permet de doser l'azote
- on estime la quantité de protéine en multipliant par 6,25 (coefficient conventionnel) le pourcentage d'azote trouvé.

Matériel : - papier à cigarette JOB dont on a coupé le côté gommé - balance de précision - petite spatule - matras de Kjeldahl de 100 ml - petit entonnoir - rampe à minéralisation - bees bunsen adaptés - hotte avec ventilation spéciale entraînant les vapeurs sulfuriques - une propipette - appareil de Parnas et Wagner modifié par Martin (Prolabo) - système de génération de vapeur d'eau - becher de 150 ml - une bouteille en plastique avec doseur automatique à siphon de 20 ml (contenant la solution borique) - une burette de précision de 25 ml avec son support, graduée au 1/10 ml - une pissette en plastique (pour eau déminéralisée) - un petit agitateur magnétique avec son moteur - un compte-minute - une pipette graduée en ml de 5 ou 10 ml un compte-gouttes ou un flacon compte-gouttes (contenant le colorant de Tashiro).

Produits chimiques :

- acide sulfurique R.P. - catalyseur de Dumazert et Marcellet (Prolabo) - solution borique (dans le flacon à doseur automatique) - indicateur coloré de Tashiro (dans le flacon compte-gouttes) - solution titrée de SO_4H_2 N/50 - lessive de soude - solution de phénol-phtaléine - eau déminéralisée ou distillée (dans une pissette en plastique),

Mode opératoire :

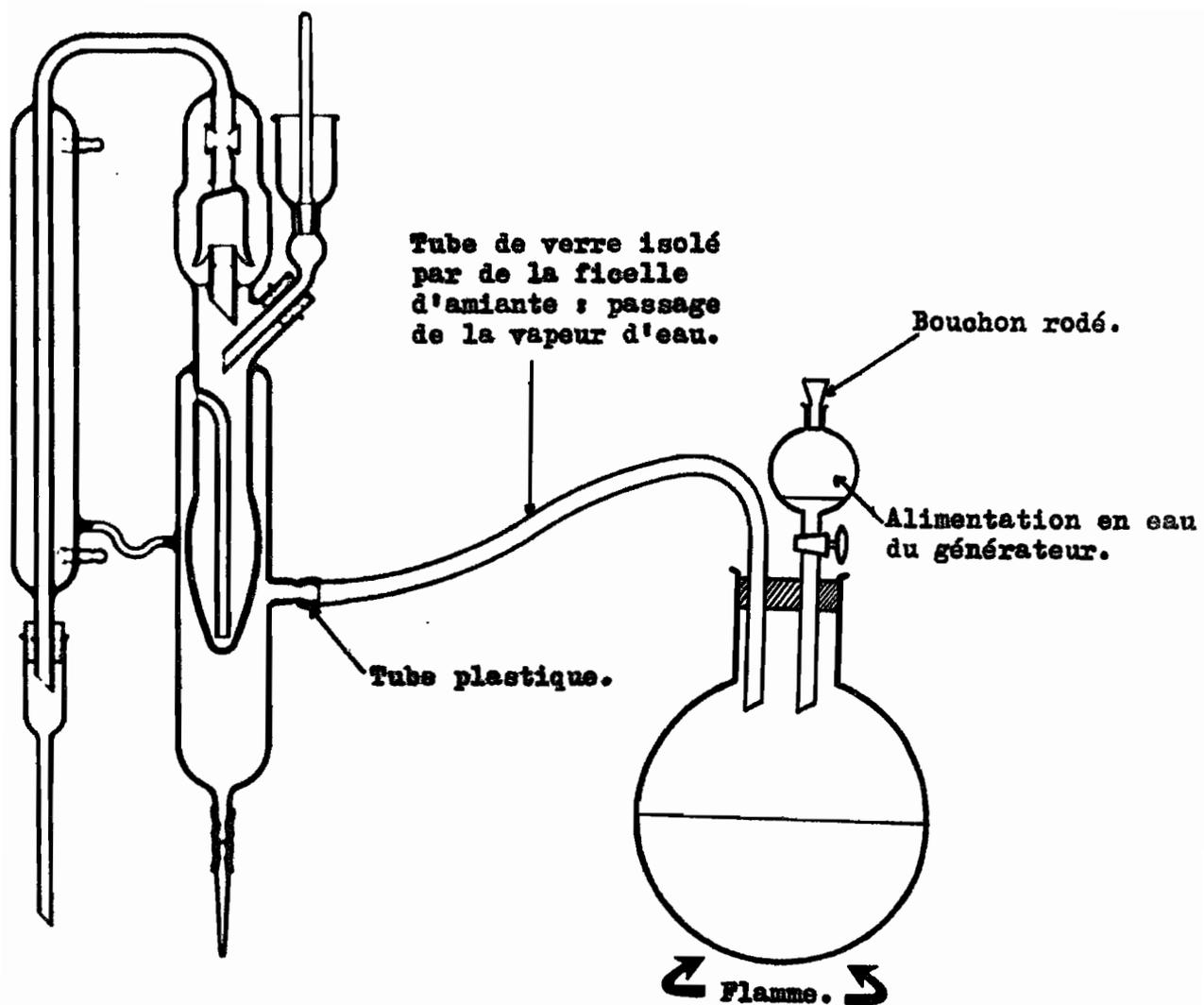
1) - minéralisation :

- on prépare un matras de Kjeldahl numéroté
- on pèse exactement une petite quantité de la matière à doser (environ 0,2g à 0,4g pour un broyat d'organe de poisson et 0,1g pour les farines de poissons) sur une feuille de papier JOB dont les bandes gommées sont enlevées aux ciseaux et tarée (ce papier ainsi préparé ne contient pas d'azote)
- on enferme l'échantillon dans le papier en tordant les deux extrémités et on le place au fond d'un matras de Kjeldahl
- on ajoute avec la petite spatule une faible quantité de catalyseur de Dumazert et Marcellet (environ 0,2g)
- on ajoute 3 ml de SO_4H_2 R.P. avec une pipette de 10 ml maniée à l'aide d'une propipette

- on agite, on laisse reposer. Le papier se dilacère dans l'acide et libère l'échantillon
- on continue la minéralisation à chaud, avec la rampe à minéralisation, à petit feu, sous la hotte munie d'un système d'aspiration des vapeurs (vapeurs de SO_4H_2 toxiques). On place sur chaque matras un petit entonnoir qui permet une condensation partielle des vapeurs sulfuriques et leur retour dans le matras
- pendant l'ébullition de l'acide sulfurique, il se forme une suspension charbonneuse dans le liquide. Celle-ci s'éclaircit peu à peu. Lorsque le liquide du matras est devenu incolore et limpide, sans aucun dépôt charbonneux sur le col du matras, la minéralisation est terminée. Elle dure environ 5 heures. On rappelle que au bout de cette opération l'azote de l'échantillon initial est minéralisé sous forme de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. On laisse refroidir avant de passer à l'étape suivante (2)
- parallèlement on fait minéraliser un "blanc" contenant seulement l'acide sulfurique, un papier JOE et le catalyseur.

2) libération et distillation de l'ammoniac

- a) on prépare l'appareil de Parnas et Wagner modifié par Martin de la façon suivante :
 - on fait couler l'eau froide dans le réfrigérant à eau
 - on remplit le ballon générateur de vapeur jusqu'aux $\frac{3}{4}$
 - on ajoute un peu de talc en poudre et quelques billes de verre pour favoriser une ébullition régulière
 - pour vérifier l'éventualité d'un mauvais fonctionnement de l'appareil (aspiration, par dépression, de la solution basique dans le ballon générateur), on acidifie le contenu de ce dernier avec un peu de SO_4H_2 et on y ajoute un peu de solution de rouge de méthyle. Ce liquide a dans les conditions normales une coloration rouge. En cas de refoulement de la solution sodée dans le ballon, il devient jaune. On sait alors que le dosage est à refaire.
 - on porte à l'ébullition le contenu du ballon générateur. L'eau arrive sous forme de vapeur chaude dans le corps de l'appareil, alors que l'acide sulfurique reste en solution dans le générateur
 - quand le corps de l'appareil est chaud, on entreprend d'y placer l'échantillon (voir b)
- b) déplacement de l'azote sous forme de gaz ammoniac. L'opération se passe dans le corps de l'appareil :
 - tout d'abord, dans un becher de 150 ml on verse 20 ml de solution borique à l'aide du doseur automatique
 - on y ajoute 10 gouttes de colorant de Tashiro : la solution prend une couleur violet améthyste
 - on place ce becher près de l'embout de distillation



**Fig. 2 - Schéma de montage de l'appareil de PARNASS et WAGNER
 modifié par MARTIN.**

- lorsque le courant de vapeur d'eau est régulièrement établi on fait tremper l'embout de distillation dans la solution borique
 - on ouvre l'ouverture de l'entonnoir en soulevant le bouchon à tige et on verse le contenu du matras intégralement en rinçant plusieurs fois rapidement avec de petites quantités d'eau déminéralisée ou distillée
 - on rebouche immédiatement
 - on verse dans l'entonnoir 20 ml (éprouvette) de solution de soude
 - on soulève doucement le bouchon à tige pour introduire la solution de soude dans l'ampoule en prenant soin d'éviter le passage de vapeurs par cet orifice
 - on replace immédiatement le bouchon et on verse un joint d'eau dans l'entonnoir avec la pissette à eau déminéralisée ou distillée. C'est à ce moment que se fait la réaction :
- $$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{NaOH} \longrightarrow \text{SO}_4\text{Na}_2 + 2\text{NH}_3 \xrightarrow{\quad} + 2\text{H}_2\text{O}$$
- on laisse fonctionner l'appareil pendant 10 minutes, temps suffisant pour que la réaction soit totale.

3) condensation de l'azote sous forme de NH_4OH dans la solution borique :

- le tube par lequel passe le courant de vapeur d'eau contenant l'ammoniac (NH_3) est coudé. Sa branche descendante est munie d'un réfrigérant à eau. Dans cette partie de l'appareil la vapeur d'eau se condense et entraîne le gaz ammoniac qui donne $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NH}_4\text{OH}$
liqui- ammo-
de niâque.
- cet ammoniac et l'eau qui l'accompagne sont reçus dans la solution borique. Cette solution devient alors basique et la couleur du colorant de Tashiro passe du violet au vert. Au bout de 10 minutes, on éloigne le becher de l'embout de distillation pour faire le dosage proprement dit

4) dosage de l'azote contenu dans le becher :

- il se fait immédiatement après la capture de l'ammoniac dans la solution borique avec du SO_4H_2 N/50, placé dans la burette
- on note le nombre de ml de SO_4H_2 N/50 nécessaires pour obtenir le virage de couleur du vert au violet commençant en passant par le gris (on arrête l'écoulement goutte à goutte immédiatement après que la couleur grise soit dépassée).

5) lavage de l'appareil :

- on éteint le bec bunsen sous le ballon générateur de vapeur d'eau : il se forme une dépression

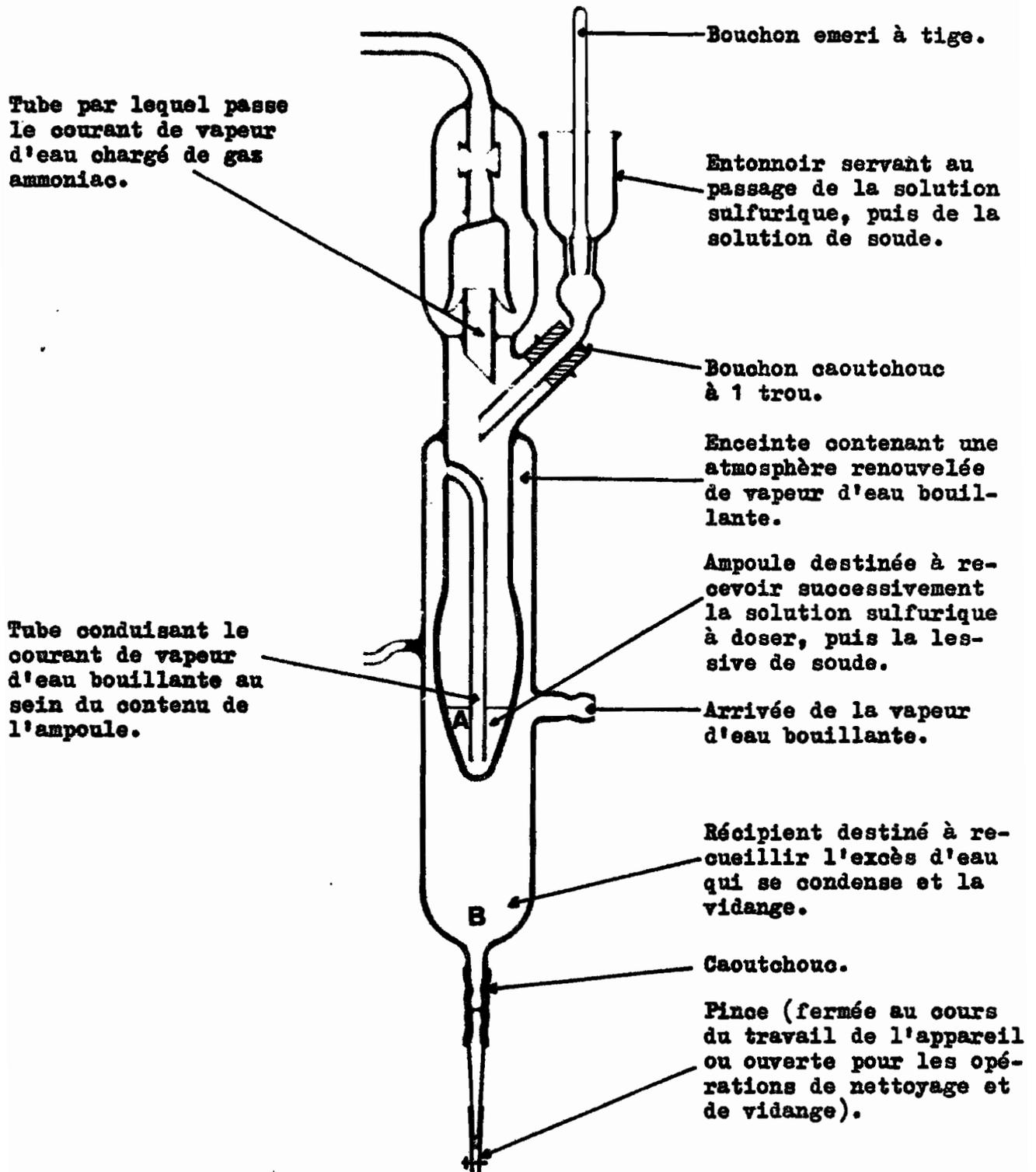


Fig. 3 - Corps de l'appareil de PARNASS et WAGNER modifié par MARTIN (Schéma du corps de l'appareil).

- le contenu de l'ampoule A se vide automatiquement par le tube plongeur et arrive au fond du récipient inférieur, en B
- on ouvre la pince et la vidange est recueillie dans un récipient
- immédiatement, on soulève le bouchon à tige et on ajoute à la pissette de l'eau déminéralisée ou distillée en abondance
- à cause de la dépression qui persiste, cette eau se deverse encore en B. Elle nettoie l'ampoule A.
- au cas où l'ampoule A serait mal vidée de l'eau de rinçage on rallume le gaz sous le ballon générateur de vapeur. Puis, quand le courant de vapeur est installé par ébullition on éteint à nouveau : la dépression vide alors l'ampoule de son eau. L'appareil est prêt pour la manipulation suivante.

6) dosage du blanc :

- on refait les mêmes manipulations avec le blanc qui contient des traces d'azote des réactifs (voir 2-3-4-5). L'expérience montre que le dosage final demande environ 0,2 ml de solution de SO_4H_2 N/50

Calculs :

- on dispose des données numériques suivantes :
 - .. le poids du papier JOB sans l'échantillon
 - .. le poids du papier JOB + l'échantillon
 - .. le nombre de ml de SO_4H_2 N/50 correspondant au dosage de l'échantillon
 - .. le nombre de ml de SO_4H_2 N/50 correspondant au "blanc"
- on en déduit :
 - .. le poids de l'échantillon
 - .. le nombre de ml de SO_4H_2 N/50 correspondant à la seule matière organique de l'échantillon
 - .. le nombre de mg d'azote qu'il contient
 - .. le pourcentage d'azote par rapport au poids frais
 - .. l'estimation du pourcentage de protéines.

Exemple :

pourcentage d'azote et de protéines dans un échantillon de crevettes Metapeneus monoceros

• Données :

poids du papier JOB seul : 0,03560 g
poids du papier JOB + échantillon : 0,32010 g
nombre de ml de SO_4H_2 N/50 pour l'échantillon : 35,9 ml
nombre de ml de SO_4H_2 N/50 pour le blanc : 0,2 ml

- Calculs :

poids de l'échantillon :

$$0,32010g - 0,03560 = 0,28450g \text{ ou } 284,5 \text{ mg}$$

nombre de ml de SO_4H_2 N/50 correspondant à la seule matière organique de l'échantillon :

$$35,9 \text{ ml} - 0,2 \text{ ml} = 35,7 \text{ ml}$$

quantité d'azote de l'échantillon :

1 ml de solution de SO_4H_2 N/50 correspond à 0,28 mg d'azote

(voir "Solution SO_4H_2 N/50")

$$0,28 \text{ mg} \times 35,7 = 9,996 \text{ mg}$$

pourcentage d'azote dans l'échantillon :

$$\frac{9,996 \times 100}{284,50} = 3,51 \%$$

estimation du pourcentage de protéines :

$$3,51 \times 6,25 = 21,94 \%$$

SOLUTION BORIQUE.

Matériel : - une balance de précision - une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre - une spatule - un entonnoir - une éprouvette de 100 ml - une éprouvette de 1 litre - un flacon en plastique de 1 litre, avec doseur automatique réglé à 20 ml.

Produits chimiques :

- acide borique R.P. cristallisé pour analyses
- alcool éthylique à 95°
- eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- peser 10g d'acide borique dans la boîte de Pétri, en s'aidant de la spatule
- transvaser dans le flacon, avec l'entonnoir
- rincer la boîte de Pétri et l'entonnoir à l'aide de 200 ml d'alcool éthylique à 95°
- agiter
- ajouter 700 ml d'eau déminéralisée ou distillée
- ajuster jusqu'à complète dissolution.

Utilisation : recueille l'ammoniaque au sortir de l'appareil Parnas et Wagner modifié par Martin. Il se forme du borate d'ammonium que l'on neutralise immédiatement par SO_4H_2 N/50 pour le dosage de l'azote.

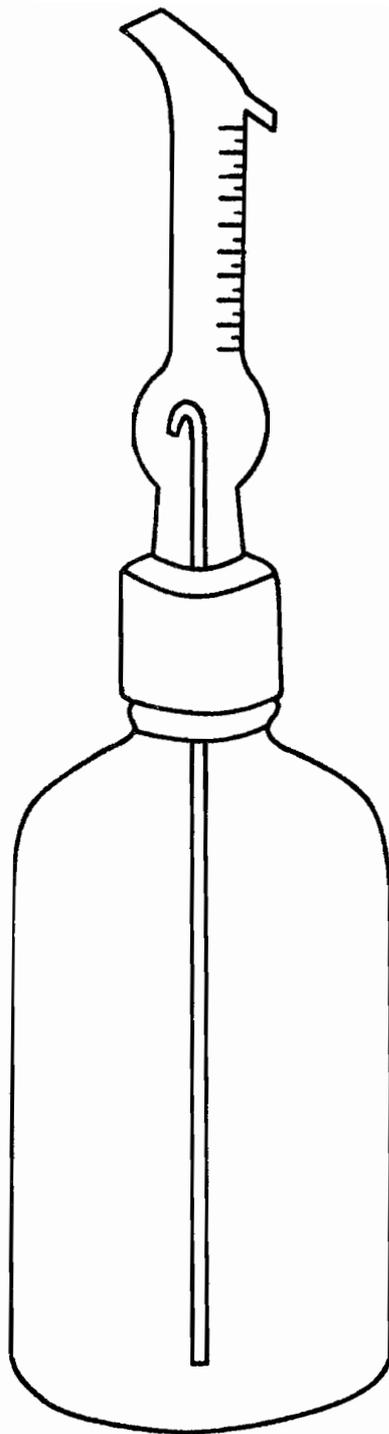


Fig. 4 - Flacon surmonté d'un doseur automatique.

SOLUTION D'ALCOOL A 50°.

Matériel : deux éprouvettes de 500 ml - une bouteille d'un litre -
- un entonnoir .

Produits chimiques :

alcool à 95° - eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- dans une éprouvette verser 500 ml d'alcool à 95°
- dans une autre éprouvette verser 480 ml d'eau
- verser le contenu des deux éprouvettes dans la bouteille de 1 litre et agiter.

Utilisation : sert à la préparation de solution de bleu de méthylène et de solution de rouge de méthyle.

SOLUTION DE BLEU DE METHYLENE DANS L'ALCOOL A 50°.

Matériel : - un verre de montre - une balance de précision - une petite spatule - un entonnoir - un flacon de 100 ml pour produit non filtré (A) - une éprouvette de 100 ml - papiers filtres "Durieux 111, filtration normale" - un flacon de 100 ml pour produit filtré (B).

Produits chimiques :

- alcool à 50° - bleu de méthylène.

Mode opératoire :

. Solution saturée, non filtrée :

- peser dans le verre de montre 25 mg de bleu de méthylène
- verser le dans le flacon A, avec l'entonnoir
- ajouter 100 ml d'alcool à 50° en rinçant l'entonnoir
- agiter, puis laisser reposer. La solution de couleur très foncée est saturée.

. Solution saturée, filtrée :

- filtrer au-dessus du flacon spécial (B); C'est le bleu de méthylène saturé et filtré.

Utilisation : sert à la préparation du réactif de Tashiro.

SOLUTION DE ROUGE DE METHYLE DANS L'ALCOOL A 50°.

Matériel : - un verre de montre - une balance de précision - une fiole

de 200 ml pour la solution saturée non filtrée (A) - un flacon de 200 ml pour la solution saturée filtrée (B) - un entonnoir - une petite spatule - papiers filtre "Durieux 111, filtration normale".

Produits chimiques :

- alcool à 50° - rouge de méthyle "RAL" (Prolabo).

Mode opératoire :

. Solution saturée, non filtrée :

- remplir la fiole avec 200 ml d'alcool à 50°
- ajouter peu à peu avec la spatule de petites quantités de rouge de méthyle et agiter
- on arrête l'opération lorsqu'un peu de rouge de méthyle se dépose au fond de la fiole : la solution est saturée (environ 0,1 mg). C'est la solution A.

. Solution saturée filtrée :

- filtrer la solution A au-dessus du flacon de 200 ml, la solution filtrée est la solution B.

Utilisation : sert à préparer le réactif de Tashiro.

REACTIF DE TASHIRO.

Matériel : un flacon compte-gouttes de 100 ml - une éprouvette de 100 ml - une éprouvette de 50 ml.

Produits chimiques :

- solution saturée et filtrée de rouge de méthyle dans l'alcool à 50° - solution de bleu de méthylène à 0,025 % dans l'alcool à 50°, filtrée.

Mode opératoire :

- préparer dans deux éprouvettes : 75 ml de solution de rouge de méthyle et 25 ml de solution de bleu de méthylène
- verser le contenu des deux éprouvettes dans le flacon compte-gouttes. On obtient une solution de couleur foncée qui donne une couleur violet-améthyste, si on ajoute 10 gouttes de ce réactif dans 20 ml de solution borique. Ce colorant devient vert dans un milieu alcalin.

Utilisation : on ajoute 10 gouttes de cette solution à la solution borique destinée à recueillir l'ammoniaque au sortie de l'appareil Parnas et Wagner. La solution d'abord violette devient verte au cours de la distillation.

Pendant le dosage par neutralisation, la coloration devient grise, puis violette dès que le milieu devient légèrement acide.

LESSIVE DE SOUDE.

Matériel : une éprouvette de 1 litre - un becher de 1 litre en pyrex - un agitateur en verre - un entonnoir - un crayon feutre - une cuvette remplie d'eau froide.

Produits chimiques :

- soude caustique R.P. en pastilles pour analyses (Prolabo)-
- eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- mettre 750 ml d'eau déminéralisée dans l'éprouvette
- verser cette eau dans le becher en pyrex
- marquer au crayon feutre le niveau d'affleurement du liquide
- reverser l'eau dans l'éprouvette
- verser 250g de soude en pastilles dans le becher en pyrex, en ayant ouvert le flacon au dernier moment
- ajouter de l'eau peu à peu en remuant avec l'agitateur. Le mélange s'échauffe.
- placer le becher chaud dans la cuvette d'eau froide (bain-marie froid). Continuer à agiter jusqu'à ce que le mélange soit dissous et froid. Au besoin, changer l'eau du bain-marie
- ajuster avec de l'eau au trait indiquant 750 ml
- verser la solution froide dans le flacon de 1 litre, boucher.

Utilisation : dans le dosage de l'azote, sert à libérer l'ammoniac par réaction :



SOLUTION DE PHENOL-PHTALEINE A 0,1 % DANS L'ALCOOL A 95°.

Matériel : une éprouvette de 50 ml - un flacon de 50 ml - un verre de montre - une petite spatule - une balance de précision - un petit entonnoir.

Produits chimiques :

- alcool à 95° - phénol-phtaléine pur cristallisé (Prolabo).

Mode opératoire :

- peser 50 mg de phénol-phtaléine dans le verre de montre à l'aide de la spatule
- verser dans l'éprouvette, avec le petit entonnoir
- ajouter de l'alcool à 95° en rinçant l'entonnoir jusqu'au niveau de 50 ml
- verser dans le flacon.

Utilisation : cette solution non colorée devient rose en milieu basique, elle sert éventuellement à vérifier que la quantité de soude versée au cours du dosage de l'azote est bien en excès.

SOLUTION DE SO_4H_2 N/50.

Matériel : une fiole jaugée de 1 litre - une pipette de précision à 2 traits de 20 ml - un flacon bouché émeri de 1 litre.

Produits chimiques :

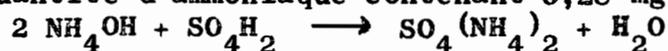
- SO_4H_2 Normal (Prolabo) - eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- dans la fiole jaugée de 1 litre, on verse avec la pipette à 2 traits 20 ml de SO_4H_2 N
- on ajoute de l'eau déminéralisée ou distillée en agitant
- on ajuste au trait de jauge
- on transvase dans le flacon spécial.

Utilisation : sert à neutraliser l'ammoniaque retenu dans la solution borique au sortir de l'appareil Parnas et Wagner modifié par Martin.

Calculs : - un ml de SO_4H_2 N/50 correspond à la neutralisation d'une quantité d'ammoniaque contenant 0,28 mg d'azote :



- 28g d'azote contenus dans NH_4OH correspondent à 1 mole de SO_4H_2
 - 28g d'azote contenus dans NH_4OH correspondent à 1 litre SO_4H_2 , 2 fois normal
 - 0,28g d'azote contenus dans NH_4OH correspondent à 1 litre SO_4H_2 0,02 N ou N/50
 - 0,28 mg d'azote contenus dans NH_4OH correspondent à un ml de SO_4H_2 N/50.
-

SOLUTION DE SO_4H_2 N/20.

Préparation analogue, mais on dilue 50 ml de SO_4H_2 N (fiolle jaugée) avec de l'eau déminéralisée ou distillée jusqu'à atteindre un volume de 1 litre (fiolle jaugée)

1 ml de SO_4H_2 N/20 correspond à 0,7 mg d'azote.

1.4. DOSAGE DES MINERAUX.

14.1. DOSAGE DES MINERAUX TOTAUX.

Principe. On calcine la substance jusqu'à ce que toutes les matières organiques soient brûlées et ainsi éliminées sous forme volatile (CO_2 , H_2O , NO_2 , etc...)

Le reste (cendres) est constitué des matières minérales.

Matériel : un creuset en silice avec un numéro gravé (diamètre d'ouverture 35 mm, hauteur 40 mm) - une petite spatule - une balance de précision - une étuve à circulation d'air - un bec bunsen - un trepied - un triangle en terre de pipe de 55 mm de côté (dimensions intérieures) - un four à moufle - un dessiccateur - un interrupteur à minuterie de 0, à 5 heures (Coupatan) - une hotte à évacuation d'air.

Produits chimiques : néant.

Mode opératoire :

- le creuset en silice est d'abord lavé, séché à l'étuve à 100° pendant 2 heures et placé dans un dessiccateur jusqu'à complet refroidissement
- on le tare
- on y ajoute une quantité de substance broyée d'environ 2g pour de la matière humide (organe de poisson) et d'environ 1g pour de la matière sèche (farine de poisson)
- on pèse exactement le poids de matière première initiale
- si la matière est humide, on la fait sécher pendant une nuit à l'étuve réglée à 100-105°C
- en suite, on incinère à l'air libre sous une hotte à évacuation d'air en s'aidant du trépied et du triangle en terre de pipe, à la flamme du bec bunsen. L'opération doit être faite avec précaution afin d'éviter un débordement de la substance au-dessus du creuset
- elle est terminée lorsqu'il n'y a plus de fumée ni de flamme sortant du creuset, alors que continue le chauffage par le bec bunsen
- on place le creuset dans le four à moufle
- on règle le four à moufle à 550°C
- on laisse le four à 550°C pendant 3 heures. (L'arrêt du chauffage est commandé par le Coupatan).

- quand le four est froid on retire le creuset et on le place pendant une heure dans l'étuve à 100-105°C
- au bout de ce temps on le place dans un dessiccateur et on laisse refroidir à la température du laboratoire (3 heures au moins)
- on pèse le creuset contenant les cendres.

Calculs : On connaît :

- le poids du creuset vide
- le poids du creuset contenant l'échantillon
- le poids du creuset contenant les cendres.

On en déduit :

- le poids de l'échantillon
- le poids des cendres
- le pourcentage des cendres dans l'échantillon.

Exemple. Dosage des matières minérales effectuées sur la partie comestible de petits anchois :

creuset vide : 10,97320 g
creuset + poisson frais : 12,52605 g
creuset + cendres : 11,00120 g
poids du poisson frais :
12,52605 - 10,97320 = 1,55285 g
poids des cendres :
11,00120 - 10,97320 = 0,02800 g
pourcentage de matières minérales :
$$\frac{0,028 \times 100}{1,55285} = 1,80 \%$$

14.2. DOSAGE DE SILICE.

(sur une farine des poissons, des crevettes ou dans des homogenats d'aliments secs):

- Principe :
- on brûle les matières organiques
 - on fait subir à plusieurs reprises au résidu minéral l'action de l'acide chlorhydrique chaud, ce qui insolubilise la silice et dissout les autres minéraux
 - on recueille la silice sur un filtre sans cendres (le liquide filtré est conservé pour faire le dosage du calcium)
 - on fait brûler le filtre et son contenu dans un creuset en silice taré préalablement.

- Matériel :
- une balance de précision - un creuset en porcelaine (diamètre 50 mm) - une spatule - un triangle en terre de pipe (dimensions intérieures 60 mm) - une hotte avec aspiration d'air - un four à moufle - un interrupteur à minuterie (éoupatan) - un bain de sable - un petit agitateur de verre - une pince - deux pipettes de 10 ml - une éprouvette

de 50 ml - un filtre sans cendres (diamètre 90 mm) - un petit entonnoir (diamètre 45 mm) - (x) un erlenmeyer de 200 ml - une étuve à 105°C - un creuset en silice - un bec bunsen.

Produits chimiques :

HCl R.P. - HCl 0,5 N - HCl 0,01 N.

Mode opératoire :

- peser avec précision une quantité voisine de 2 grammes de farine (ou 5 grammes au cas où elle contient très peu de silice) dans la capsule en faïence
- incinérer à l'air libre au-dessus de la flamme d'un bec bunsen dans une hotte à aspiration d'air, en posant la capsule sur le triangle en terre de pipe
- puis incinérer dans le four à moufle à 550°C pendant 3 heures (Coupatan) laisser refroidir
- ajouter à la pipette quelques ml de HCl R.P. goutte à goutte en triturant les cendres avec un agitateur jusqu'à ce que les cendres soient baignées dans HCl
- faire évaporer HCl sur le bain de sable
- ajouter encore deux fois HCl et faire évaporer dans les mêmes conditions
- quand tout l'acide chlorhydrique est évaporé mouiller les cendres avec 5 ml (pipette) de HCl 0,5 N
- faire chauffer doucement pendant 10 minutes la capsule au-dessus du bec bunsen en la calant sur le triangle en terre de pipe
- filtrer à travers d'un filtre sans cendres placé dans l'entonnoir au-dessus de l'erien
- ajouter encore 5 ml de HCl 0,5 N dans la capsule et recommencer chauffage et filtration

Les minéraux solubles dans l'acide chlorhydrique passent à travers le filtre. La silice est retenue sur le filtre.

- laver la capsule et le filtre avec HCl N/100 (lavage prolongé avec 30 ml de liquide) (le contenu de l'erien est utilisé pour le dosage du calcium)
- faire secher le filtre dans l'étuve à 105°C : l'eau et l'acide chlorhydrique du filtre s'évaporent
- peser un creuset en silice sec
- y placer, en le pliant, le filtre sans cendres seché avec son contenu
- incinérer à l'air libre
- puis incinérer au four à moufle (3 heures à 550°C)
- laisser refroidir
- placer une heure le creuset en silice dans l'étuve à 105°C
- puis dans un dessiccateur pendant 3 heures
- peser le creuset contenant la silice

Calculs. On connaît les poids suivants :

- coupelle vide

- coupelle contenant la farine
- creuset en silice vide
- creuset en silice plus silice à doser.

On en déduit :

- le poids de farine
- le poids de silice correspondante
- le pourcentage de silice dans la farine.

Exemple.:Farine de têtes de crevettes fabriquée au laboratoire :

capsule vide : 13,38910 g
capsule + farine : 15,37980 g
poids de farine : 1,99070 g

creuset vide : 10,63170 g
creuset + silice : 10,63905 g
silice : 0,00735 g

pourcentage de silice :

$$\frac{0,00735 \times 100}{1,99070} = 0,37 \%$$

HCl environ 0,5 N.

On dispose de HCl R.P. (Prolabo) de normalité voisine de 12.
Un volume de cette solution étendue à 24 volumes avec de l'eau donne une solution voisine de 0,5 N.

Matériel : une éprouvette de 50 ml - une éprouvette de 1 litre - un flacon de 1 litre - un agitateur en verre.

Produits chimiques :

HCl R.P. (Prolabo) - eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- mesurer 42 ml de HCl R.P. dans la petite éprouvette
- verser dans la grande éprouvette 100 ml d'eau
- ajouter le HCl R.P., rincer la petite éprouvette
- ajouter de l'eau jusqu'à 1000 ml
- agiter le mélange
- verser dans le flacon.

Utilisation : sert à entraîner la silice et les sels solubles dans l'acide chlorhydrique pour la séparation de la silice par filtration.

HCl environ 0,01 N.

On dispose d'une solution de HCl voisine de 0,5 N.

Un volume étendu à 50 volumes avec de l'eau donne une solution voisine de 0,01 N.

Matériel : - une pipette de 20 ml - une éprouvette de 1000 ml - un agitateur - un flacon de 1 litre.

Produits chimiques :

- HCl voisine de 0,5 N - eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- mesurer 20 ml de HCl 0,5 N avec la pipette
- verser dans l'éprouvette
- ajouter de l'eau pure jusqu'à un litre
- agiter avec l'agitateur
- verser dans le flacon.

Utilisation : sert à laver la silice des sels solubles dans l'acide chlorhydrique qui l'accompagnent au cours de la séparation de la silice par filtration.

14.3. DOSAGE DU CALCIUM.

Principe. On solubilise le phosphate de calcium par l'acide chlorhydrique, on se débarrasse de la silice par filtration. On ajoute un excès d'acide oxalique, puis de l'ammoniaque jusqu'à neutralisation. Il se forme un précipité d'oxalate de calcium que l'on sépare par filtration



on sèche à 90°C, on pèse.

Dans la pratique, on fait le dosage du calcium sur le liquide filtré, résidu du dosage de silice.

Matériel : se reporter au dosage de silice jusqu'à (x) (p.27; 2^e ligne), puis :

- 3 pipettes de 10 ml - papier pH (1 à 10) - filtre taré de 90 mm de diamètre - un petit entonnoir de 45 mm de diamètre.
- un becher de 50 ml - une étuve à 90°C - une pince en bois.
- un verre à pied de 15 cm de haut.

Produits chimiques : voir les produits pour dosage de silice puis :

acide oxalique en solution saturée - HCl R.P. - solution de chlorure de calcium - ammoniaque R.P.

Mode opératoire :

- on dispose de l'erlen de 200 ml contenant environ 40 ml de filtrat après séparation de la silice
- on ajoute 2 ml de HCl R.P.
- puis 20 ml de solution saturée d'acide oxalique
- s'il se forme un trouble, ajouter de l'acide chlorhydrique goutte à goutte jusqu'à ce que la solution redevienne complètement limpide
- porter à l'ébullition en tenant le col de l'erlen avec une pince en bois
- neutraliser alors avec de l'ammoniaque ajouté goutte à goutte en évitant de mettre un excès notable d'ammoniaque (papier pH)
- maintenir en ébullition assez vive pendant 10 minutes pour expulser la plus grande partie de l'ammoniaque en léger excès ; pendant ce temps, agiter l'erlen en le tenant avec la pince en bois
- puis incliner l'erlen sur un verre à pied de 15 cm de haut
- on obtient un précipité d'oxalate de calcium qui se rassemble au fond de l'erlen très rapidement
- laisser reposer une ou deux minutes jusqu'à clarification complète
- peser un filtre préalablement séché à 105°C, refroidi et conservé dans un dessiccateur
- décanter en filtrant le liquide surnageant clair
- puis filtrer le précipité en rinçant l'erlen et le filtre avec de l'eau distillée ou déminéralisée chaude

Verifier s'il reste des traces d'acide oxalique dans le liquide de filtration au moyen d'un petit becher contenant une petite quantité de solution (limpide) de chlorure de calcium. Si le liquide de filtration contient encore de l'acide oxalique, il se forme dans le petit becher un précipité laiteux d'oxalate de calcium

- on rince jusqu'à ce qu'il n'y ait plus trace d'acide oxalique
- on sort le filtre égoutté de l'entonnoir et on le sèche d'abord à 40°C, jusqu'à ce qu'il semble sec (pendant une nuit), puis à 90°C pendant 4 heures (l'eau de la molécule d'oxalate est ainsi conservée)
- on place dans un dessiccateur pendant 3 heures
- on pèse rapidement.

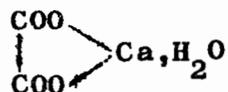
Calculs : on connaît les poids suivants :

- capsule vide
- capsule contenant la farine
- filtre sec vide
- filtre sec contenant l'oxalate de calcium.

on en déduit :

- le poids de farine
- le poids d'oxalate de calcium correspondant

le pourcentage de calcium sachant que



une mole pèse 146 grammes et contient
40 grammes de calcium

un gramme d'oxalate contient :

$$\frac{40}{146} = 0,27397 \text{ g de calcium}$$

Exemple : farine de têtes de crevettes fabriquée au laboratoire

capsule vide : 13,38910 g
capsule + farine : 15,37980 g
poids de farine : 1,99070 g
filtre vide : 0,43995 g
filtre + oxalate : 0,95940 g
poids d'oxalate : 0,51945 g

pourcentage de calcium :

$$\frac{0,51945 \times 100 \times 0,27397}{1,99070} = 7,15 \%$$

SOLUTION SATURÉE D'ACIDE OXALIQUE.

Matériel : un becher de 250 ml - une spatule - une balance - une fiole jaugée de 500 ml - un bain-marie tiède - un entonnoir - une pissette pour eau distillée ou déminéralisée - un filtre en verre fritté n° 4 - un agitateur de verre.

Produits chimiques :

acide oxalique R.P. (Prolabo) - eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- peser 110g d'acide oxalique dans le becher
- le verser dans le flacon de 500 ml surmonté de l'entonnoir
- entraîner les cristaux avec de l'eau (pissette)
- ajouter de l'eau jusqu'aux 3/4 du flacon
- agiter en faisant dissoudre au bain-marie tiède
- ajuster au trait de jauge (approximativement)
- laisser refroidir jusqu'au lendemain
- il se forme au fond de la fiole des cristaux d'acide oxalique
- recueillir la solution saturée surnageante en filtrant avec un filtre en verre fritté de porosité 4.

Utilisation : cette solution est utilisée pour capter le calcium sous forme d'oxalate de calcium insoluble que l'on isole, sèche et pese.

SOLUTION CONCENTREE DE CHLORURE DE CALCIUM.

Matériel : - un becher de 250 ml - une spatule - une balance - un petit entonnoir - un flacon de 100 ml - une pissette pour eau déminéralisée ou distillée.

Produits chimiques :

- chlorure de calcium purifié (Prolabo)
- eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

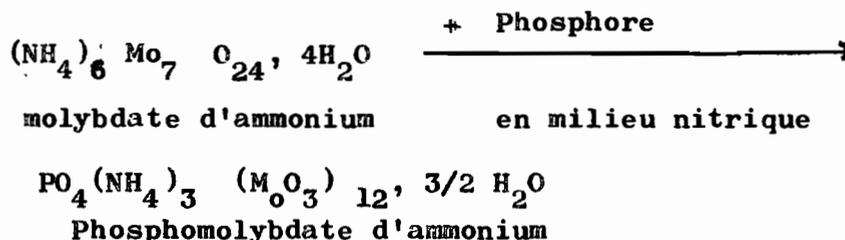
- peser 70 grammes de chlorure de calcium dans le becher
- le verser dans le flacon surmonté d'un entonnoir en entraînant avec un filet d'eau (pissette)
- le chlorure de calcium volumineux se dissout facilement
- finir de remplir le flacon avec de l'eau.

Utilisation : sert à vérifier le liquide du rinçage du précipité d'oxalate de calcium contient encore de l'acide oxalique. En l'absence d'acide oxalique, la solution de chlorure de calcium reste limpide. En présence d'acide oxalique, elle se trouble (aspect laiteux) par la précipitation d'oxalate de calcium insoluble.

14.4. DOSAGE DU PHOSPHORE.

(sur une farine de poissons ou de crustacés ou sur un homogenat de poisson sec ou de crustacé sec.).

Principe. - on élimine les matières organiques de l'échantillon par incinération
- on élimine la silice qui fausserait le dosage par insolubilisation par l'acide nitrique suivie d'une filtration
- puis on fait précipiter le phosphore du liquide filtré sous forme de phosphomolybdate d'ammonium en ajoutant une quantité suffisante de molybdate d'ammonium en solution nitrique



- on filtre le précipité, on le sèche à 90°C, on le pèse et on calcule la quantité de phosphore qu'il contient.

Matériel : - une balance de précision - une capsule en porcelaine de 50 mm de diamètre - un bec bunsen - un trépied - un triangle en terre de pipe dimensions inférieures 50 mm - un four à moufle - un interrupteur à minuterie (Coupatan) - une pipette de 10 ml (pour NO_3H) pur - un bain de sable - un petit agitateur de verre - un filtre de 7 cm de diamètre - un entonnoir de 45 mm de diamètre - une pince - deux erlens de 200 ml - un becher de 250 ml - une pipette de 10 ml pour NO_3H 0,5 N - une boîte de pétri - une étuve à circulation d'air - une éprouvette de 50 ml pour NO_3H 0,01 N - une éprouvette de 100 ml pour réactif nitromolybdique - un becher de 50 ml - une pipette de 10 ml pour test de fin de réaction - un petit entonnoir - un petit filtre - un agitateur de verre recouvert d'un manchon de caoutchouc - un dessiccateur.

Produits chimique :

acide nitrique pur - acide nitrique 0,5 N - acide nitrique 0,01 N - liquide de rinçage nitrique : 1 vol. de NO_3H pur sur 8 vol. d'eau - réactif nitromolybdique - liquide de rinçage nitromolybdique (réactif nitromolybdique dilué de moitié) - alcool méthylique.

Mode opératoire :

pesée :

- on pèse un gramme de farine dans une capsule en porcelaine.

incinération :

- on incinère d'abord à l'air libre en posant la capsule sur un triangle en terre de pipe au-dessus de la flamme d'un bec bunsen
- on incinère ensuite au four à moufle pendant 3 heures à 550°C (arrêt automatique par le Coupatan)
- on laisse refroidir dans le four.

insolubilisation de la silice :

- on ajoute aux cendres quelques ml d'acide nitrique pur, avec précaution, goutte à goutte, avec une pipette
- on triture avec un petit agitateur de verre qu'on rince ensuite au-dessus de la capsule avec quelques gouttes de NO_3H pour le débarrasser des particule solide qui y adhèrent
- on fait chauffer au bain de sable jusqu'à siccité
- on recommence encore deux fois l'addition d'acide nitrique, la trituration, l'évaporation
- la silice est alors insolubilisée. (On va l'éliminer par filtration. Les autres minéraux sont solubles dans une solution d'acide nitrique).

filtration de la silice :

- on filtre au-dessus d'un erlen de 200 ml, avec un entonnoir et un petit filtre en rinçant la capsule successivement avec 10ml (pipette) de solution d'acide nitrique 0,5 N (en deux fois) puis 30 ml (éprouvette) d'acide nitrique 0,01 N (en plusieurs fois)
- on jette le filtre qui contient la silice et on continue les opérations sur le liquide filtré.

acidification du milieu contenant les phosphates en solution:

- on ajoute dans l'erlen 5 ml de NO_3H pur
- on agite
- pour faciliter la suite des manipulations, on transvase intégralement dans un becher de 250 ml en rinçant avec une solution de même concentration en acide nitrique (rinçage nitrique : 1 vol. NO_3H pur et 8 vol. d'eau distillée ou déminéralisée).

précipitation du phosphore sous forme de phosphomolybdate d'ammonium :

- on ajoute 150 ml (éprouvette) de molybdate d'ammonium en solution nitrique (réactif nitromolybdique) en faisant couler le liquide le long des parois
- on laisse reposer une heure sans y toucher. Au bout d'une heure, on agite le liquide sans toucher aux parois de verre
- puis on recouvre avec une boîte de pétri et on place pendant plusieurs heures (une nuit) dans une étuve à 36-40°C.

Le phosphore donne un précipité jaune de phosphomolybdate d'ammonium. Mais il se peut que tout le phosphore n'ait pas donné de précipité si la quantité de réactif nitro-molybdique était insuffisante. Il faut donc vérifier que la réaction est bien terminée avant de filtrer le phosphomolybdate d'ammonium. Lorsque la réaction est terminée, le liquide surnageant est limpide et incolore. On s'en assure en prélevant 5 ml, avec une pipette que l'on verse dans un becher de 50 ml, on y ajoute 5 ml de réactif nitromolybdique et on place à l'étuve à 36-40°C (à côté du becher de 250 ml initial) pendant 2 heures. Au bout de ce temps, si le contenu du petit becher est resté limpide et incolore, c'est que la réaction dans le grand becher est terminée.

S'il s'est formé dans le becher une teinte jaune, c'est que l'addition de réactif nitromolybdique a permis la précipitation d'une nouvelle quantité de phosphore. Dans ce cas, il n'y a pas assez de réactif nitromolybdique dans le grand becher. On en ajoute 50 ml, on laisse encore 2 heures à 36-40°C, puis on contrôle de nouveau si la réaction est terminée en répétant la même opération avec un 2ème petit becher etc...

filtration du phosphomolybdate d'ammonium :

- lorsque tout le phosphore est précipité, on filtre le phosphomolybdate d'ammonium au-dessus d'un filtre séché et taré
- à la fin de la filtration on détache la poudre de phosphomolybdate d'ammonium qui adhère aux parois du becher avec un agitateur dont le bout est recouvert d'un manchon de caoutchouc
- on rince d'abord avec du liquide de rinçage nitromolybdique puis avec de l'alcool méthylique qui détache du verre le précipité.

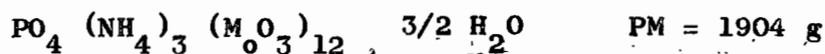
séchage et pesée :

- quand tout le précipité est sur le filtre, on porte le filtre et son entonnoir (posé sur un erlen sec) à l'étuve à 90°C pendant 4 heures, puis on le met dans un dessiccateur. Au bout de 3 heures quand la température du filtre est bien équilibrée avec celle du laboratoire, on pèse rapidement avec la balance de précision.

Calculs. On dispose des données suivantes :

- le poids de la capsule vide
- le poids de la capsule + échantillon
- poids du filtre sec vide
- poids du filtre avec le précipité de phospho-molybdate d'ammonium.

Une mole de phosphomolybdate d'ammonium



contient un atome-gramme de phosphore $\text{P} = 31 \text{ g}$

1 gramme de précipité contient :

$$\frac{31}{1904} = 0,01628 \text{ g de phosphore}$$

On calcule :

- le poids de l'échantillon de farine
- le poids de précipité
- le pourcentage de phosphore dans l'échantillon.

Exemple. Dosage de phosphore sur un homogénant de crevettes séchées du marché (makambas):

cupelle + homogénant	= 34,34360 g
cupelle vide	= 33,34355 g
poids d'homogénat	= 1,00005 g
filtre + phosphomolybdate d'ammonium	= 0,97490 g
filtre vide	= 0,45480 g
poids de précipité	= 0,52010 g

Pourcentage de phosphore dans l'homogénat :

$$\frac{0,52010 \times 100 \times 0,01628}{1,00005} = 0,85 \%$$

ACIDE NITRIQUE 0,5 N (environ).

On dispose d'acide nitrique R.P. de densité 1,33 à 53 % en poids de NO_3H dont le poids moléculaire est 63 g. Sa normalité est de :

$$1330 \times \frac{53}{100} \times \frac{1}{63} = 11,189 \text{ N}$$

Pour avoir une solution 0,5 N, il faut donc le diluer 22,378 fois, c'est-à-dire en étendre :

$$\frac{1000}{22,378} = 44,69 \text{ cm}^3 \text{ à un litre.}$$

Matériel : - une éprouvette de 50 ml - une fiole jaugée de 1 litre - un entonnoir - une pissette pour eau déminéralisée ou distillée.

Produits chimiques :

acide nitrique R.P. d = 1,33 - eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- dans la fiole de 1 litre verser un fond d'eau, puis 45 ml d'acide nitrique R.P. mesurés à l'éprouvette, rincer l'éprouvette, agiter la fiole. Le mélange s'échauffe
- ajouter de l'eau sans arriver au trait de jauge
- laisser refroidir
- ajuster à un litre avec de l'eau.

Utilisation : sert à entraîner les sels solubles dans l'acide nitrique (et parmi eux les phosphates) lorsqu'on se débarrasse de la silice par filtration avant le dosage du phosphore.

ACIDE NITRIQUE 0,01 N (environ).

On dispose d'acide nitrique 0,5 N (environ). Se reporter à la confection d'acide chlorhydrique 0,01 N à partir d'acide chlorhydrique 0,5 N.

Utilisation : sert à rincer le filtre contenant la silice pour entraîner les sels solubles dans l'acide nitrique que ce filtre pourrait retenir. Parmi ces sels sont les phosphate contenant le phosphore à doser.

RINCAGE NITRIQUE.

Matériel : une éprouvette de 100 ml - une éprouvette de 1 litre en

pyrex - un agitateur de verre - un flacon de 1 litre - un entonnoir.

Produits chimiques :

- acide nitrique pur - eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- verser un peu d'eau pure au fond de la grande éprouvette
- verser ensuite avec précaution 100 ml (petite éprouvette) de NO_3H pur
- remuer avec l'agitateur de verre, (le mélange s'échauffe)
- ajouter de l'eau dans la grande éprouvette, laisser refroidir
- ajuster à 990 ml
- transvaser dans un flacon d'un litre.

Utilisation : sert à rincer l'erien ayant contenu la solution de phosphates en milieu nitrique lorsqu'on la transvase dans un becher.

REACTIF NITROMOLYBDIQUE.

Matériel : - une balance - un becher de 400 ml - deux éprouvettes de 1 litre - une pissette en plastique pour eau distillée ou déminéralisée - un agitateur en verre - un ballon de 2 litres - un entonnoir - un bain-marie tiède.

Produits chimiques :

molybdate d'ammonium R.P. (Prolabo) - eau distillée ou déminéralisée - acide nitrique R.P. (Prolabo).

Mode opératoire :

a) Solution aqueuse de molybdate d'ammonium

- peser dans le becher 150 g de molybdate d'ammonium
- ajouter de l'eau et faire dissoudre au bain-marie tiède
- transvaser dans une éprouvette de 1 litre en rinçant les parois du becher à l'eau (pissette)
- laisser refroidir
- ajuster à 1 litre.

b) Acide nitrique

- dans la deuxième éprouvette mesurer un litre d'acide nitrique R.P.

c) Réactif nitromolybdique

- dans un ballon de 2 litres surmonté d'un entonnoir verser successivement la solution aqueuse de molybdate d'ammonium, puis l'acide nitrique avec précaution. Le mélange commence par se troubler d'un nuage blanc qui se dissipe

avec le temps. Laisser reposer, 6 jours avant l'emploi, dans un endroit tiède (température du laboratoire 27°C). Au cas où il se formerait un dépôt, on recueille le liquide clair qui seul est utilisé.

Utilisation : sert à précipiter le phosphore en milieu nitrique sous forme de phosphomolybdate d'ammonium insoluble.

RINCAGE NITROMOLYBDIQUE.

C'est la dilution au 1/20ème, avec de l'eau du réactif nitromolybdique.

Matériel : une éprouvette de 50 ml - une éprouvette de 1 litre - un flacon de 1 litre - une pissette pour eau déminéralisée ou distillée.

Produits chimiques :

- réactif nitromolybdique - eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

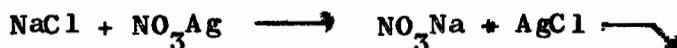
- mesurer 50 ml de réactif nitromolybdique dans la petite éprouvette
- les verser dans la grande éprouvette
- rincer la petite éprouvette
- ajouter de l'eau distillée ou déminéralisée dans la grande éprouvette jusqu'à un litre
- transvaser dans le flacon.

Utilisation : cette solution sert à entraîner au besoin le précipité de phosphomolybdate d'ammonium dans le filtre destiné à le recueillir.

14.5. DOSAGE DU CHLORURE DE SODIUM.

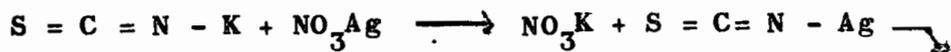
(dans une farine de poissons ou dans un homogenat d'aliment sec: poissons séchés, poissons salés et séchés, crevettes séchées).

Principe. Le chlorure de sodium à mesurer est mis en présence d'une quantité connue de nitrate d'argent. Il se forme du chlorure d'argent qui précipite en une poudre blanche, en quantité correspondant au chlorure de sodium initial :



On ajuste à un volume connu, on filtre et sur une partie

aliquote du filtrat, on dose l'excès de NO_3Ag par une solution de sulfocyanure titrée, en présence d'alun ferrique en solution nitrique comme indicateur coloré.



On évalue le chlorure de sodium initial par différence.

Matériel : - une boîte de pétri de 9,5 cm de diamètre - une balance de précision - une spatule - une fiole jaugée de 50 ml - un agitateur de verre - un bain-marie tiède - un bain-marie froid - un filtre en verre fritté porosité 3, diamètre 70 mm, hauteur 50 mm - une pompe à vide - une fiole à vide - une fiole jaugée de 100 ml - une pipette de 5 ml graduée - une pipette de 10 ml graduée - une propipette - deux pipettes de précision de 10 ml - un compte-minute - papier filtre ordinaire - un entonnoir (9 cm de diamètre) - un erlenmeyer de 200 ml - une fiole jaugée de 50 ml - une fiole jaugée de 25 ml - une pissette en plastique pour eau distillée ou déminéralisée - une burette (pour le SCNK) - un agitateur magnétique - 2 bechers (50 et 250 ml).

Produits chimiques :

- solution saturée d'alun de fer et d'ammonium -
- acide nitrique pur - nitrate d'argent N/10 -
- sulfocyanure de potassium N/10.

Mode opératoire :

- dans le petit becher peser au 5/100 de mg une quantité d'homogénat ou de farine pouvant aller de 1 à 10 g (en fonction de la teneur en sel de la substance)
- mesurer 50 ml d'eau distillée ou déminéralisée à l'aide d'une fiole jaugée
- transvaser le contenu du petit becher dans un becher de 250 ml en rinçant le petit becher avec le 50 ml d'eau
- mettre le mélange au bain-marie tiède (40°C) pendant deux minutes en le remuant avec l'agitateur de verre. Le sel de la farine se répartit dans l'eau
- faire refroidir à la température ordinaire en accélérant avec un bain-marie froid
- filtrer sur le filtre en verre fritté bien sec au-dessus d'une fiole à vide bien sèche
- prendre en 3 fois avec une pipette de 10 ml à 2 traits 30 ml de filtrat et verser dans une fiole jaugée de 100 ml
- ajouter dans la fiole :
 - . 2,5 ml de solution d'alun avec la pipette de 5 ml
 - . 5 ml de NO_3H pur avec la pipette de 10 ml et la propipette
 - . 30 ml de NO_3Ag N/10 avec une pipette de précision de 10 ml
- il se forme un précipité de chlorure d'argent
- compléter le volume à 100 ml (trait de jauge) avec de l'eau distillée ou déminéralisée

- attendre 5 minutes
 - filtrer au-dessus de l'erlen de 200 ml avec l'entonnoir et le papier filtre
 - verser respectivement 50 ml et 25 ml de filtrat dans deux bechers à l'aide de deux fioles jaugées
 - rincer dans les deux bechers les fioles jaugées à l'aide de l'eau distillée ou déminéralisée (pissette)
 - doser sur ces fractions la quantité de nitrate d'argent avec du sulfocyanure de potassium titré
 - il se forme un précipité blanc de sulfocyanure d'argent le liquide de jaune paille devient rouge (coloration de l'alun) à la première goutte d'excès de sulfocyanure soit n' le nombre de ml nécessaires à la réaction sur 50 ml et $\frac{n''}{2}$ le nombre de ml nécessaires sur 25 ml
- On prend la moyenne :

$$n = \frac{n' + n''}{2}$$

Calculs. On a les réactions suivantes :



1 molécule gramme de ClNa pèse 58,5 g

1 litre de NO_3Ag normal doserait : 58,5 g de ClNa

1 ml de NO_3Ag N/10 dose ; 5,85 mg de ClNa

Soit X grammes le poids de farine ou d'homogenat pesés au départ

- le sel contenu dans cette quantité se répartit dans les 50 ml d'eau ajoutée. Sur ces 50 ml, on prend 30 ml que l'on fait réagir avec NO_3Ag , ce qui correspond à un poids de matière première correspondant aux $\frac{3}{5}$ de X
- on fait réagir 30 ml de NO_3Ag N/10 sur cette quantité de matière
- après avoir ajusté à 100 ml, on fait le dosage de l'excès de nitrate d'argent d'une part sur 50 ml qui correspondent à $\frac{3}{10}$ de X ou 0,3 X et qui contiennent 15 ml de NO_3Ag N/10 et d'autre part sur 25 ml qui contiennent 7,5 ml de NO_3Ag

Soit n le nombre de ml de sulfocyanure de K N/10 nécessaires à la réaction :

la quantité de NO_3Ag N/10 ayant servi à la réaction du ClNa contenu dans $\frac{3}{10}$ X grammes est (15 ml - n ml)

Comme 1 ml permet de doser 5,85 mg de ClNa la quantité de sel correspondante est (en supposant le nitrate d'argent et le sulfocyanure rigoureusement N/10)

$$5,85 \text{ mg} \times (15 - n)$$

Cette quantité de sel, exprimée en mg est contenue dans

$$\frac{3}{10} \text{ X grammes de substance.}$$

En s'exprimant en grammes de sel pour 100 grammes de produits étudié, on obtient :

Nombre de grammes de ClNa pour 100g de substance =

$$\frac{5,85 \times (15 - n) \times 100}{0,3 \times 1000} =$$

$$\frac{(15 - n) \times 0,585}{0,3 \times} =$$

Exemple : Dosage du sel contenu dans une farine de têtes de crevettes

Poids de l'échantillon de farine :

boîte de pétri + farine = 53,54260 g
 boîte de pétri vide = 48,54035 g
 poids de la farine = 5,00225 g

titre du nitrate d'argent : 0,1 N x 1,010

titre du sulfocyanure de potassium : 0,1 N x 1,098

nombre de millilitres de sulfocyanure : 9,30 ml

pourcentage de sel dans la farine étudiée :

$$\frac{(15 \times 1,01) - (9,30 \times 1,098) \times 0,585}{0,3 \times 5,00225} = 1,93 \%$$

SOLUTION SATURÉE D'ALUN DE FER ET D'AMMONIUM.

Matériel : - une boîte de pétri - une spatule - une balance - une fiole jaugée de 250 ml avec bouchon - un entonnoir - une pissette en plastique pour eau - un filtre en verre fritté (porosité 4) - une pompe à vide ou une trompe à vide - une fiole à vide.

Produits chimiques :

- alun de fer et d'ammonium (Prolabo, R.P. pour analyses) -
- eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- peser 100 g d'alun dans la boîte de pétri
- verser dans l'entonnoir placé au-dessus de la fiole jaugée
- entraîner au jet d'eau (pissette)
- rincer à l'eau la boîte de pétri et l'entonnoir
- agiter, laisser reposer jusqu'à ce que la température soit équilibrée (le mélange se fait avec refroidissement)
- ajuster à 250 ml

On vérifie que la solution est bien saturée par l'existence d'un dépôt de cristaux d'alun au fond du récipient.

- filtrer sur verre fritté (porosité 4) en faisant le vide.

Utilisation : sert d'indicateur coloré pour doser l'excès de NO_3Ag par le SCNK après la formation de ClAg dans le dosage de ClNa . La coloration jaune pâle devient rouge brique persistante dès la fin de la réaction.

NITRATE D'ARGENT N/10.

Poids moléculaire du nitrate d'argent :

$$\text{NO}_3\text{Ag} = 14 + 48 + 108 = 170 \text{ g}$$

Un litre de nitrate d'argent N/10 contient 17g de nitrate d'argent.

Dans la pratique, on en pèse 17,30g en tenant compte de l'eau d'interposition toujours présente dans les conditions ordinaires.

Matériel : une balance - une boîte de pétri - une spatule - un entonnoir - une fiole jaugée de 1 litre - une pissette à eau distillée ou déminéralisée - une pipette de 1 ml - une éprouvette de 500 ml.

Produits chimiques :

- NO_3Ag R.P. pour analyses (Prolabo) - acide nitrique R.P..

Mode opératoire :

- on pèse dans la boîte de pétri 17,3g de nitrate d'argent
- on verse dans la fiole jaugée au-dessus d'un entonnoir en entraînant les cristaux avec le jet d'eau (pissette)
- on ajoute 500 ml d'eau distillée ou déminéralisée (éprouvette)
- on agite jusqu'à complète dissolution
- on ajoute 1 ml d'acide nitrique pour éviter que se fasse ultérieurement un dépôt d'argent ou d'oxyde d'argent (cette addition ne sera pas une gêne pour le dosage du ClNa , la précipitation du chlorure d'argent s'effectuant en milieu nitrique)
- on ajoute de l'eau distillée ou déminéralisée jusqu'au trait de jauge.

Cette solution est voisine de N/10. On en précisera le titre au moyen d'une solution de ClH N/10 rigoureusement titrée.

Utilisation : lorsque son titre est précisé rigoureusement, cette solution sert pour doser le ClNa . En présence de ClNa , le nitrate d'argent en excès et en quantité connue donne du chlorure d'argent qui précipite. On dose l'excès de nitrate d'argent par le sulfocyanure de potassium titré.

TITRAGE VOLUMETRIQUE DU NITRATE D'ARGENT N/10.
(au moyen de HCl N/10 rigoureusement titré).

Principe : Le nitrate d'argent, en présence des ions Cl⁻ donne du chlorure d'argent qui précipite :



En présence de CO₃Ca et de chromate de potassium le précipité prend une coloration rose persistante dès la première goutte d'excès de NO₃Ag, ce qui indique la fin de la réaction.

Matériel : - une balance - une pipette de 10 ml à 2 traits - un becher de 50 ml - un agitateur magnétique - une burette pour NO₃Ag à titrer.

Produits chimiques :

- NO₃Ag voisin de N/10 à titrer -
- ClH N/10 rigoureusement titré (normadose, Prolabo)-
- CO₃Ca pur (R.P. Prolabo)-
- chromate de potassium au 1/10.

Mode opératoire :

- mettre dans la burette de nitrate d'argent à titrer, voisin de N/10
- dans le becher de 50 ml verser 10 ml (pipette) de HCl rigoureusement N/10
- ajouter 0,10g de CO₃Ca (une pincée)- agiter
- ajouter trois gouttes de chromate de K au 1/10 (la coloration est jaune clair)
- ajouter goutte à goutte le nitrate d'argent à titrer. Il se forme un précipité blanc de chlorure d'argent qui devient rose à la première goutte d'excès de NO₃Ag.

Exemple :-pour 10 ml de HCl rigoureusement N/10, il a fallu 9,9 ml de NO₃Ag N/10 dont le titre est à préciser

-le titre du NO₃Ag est légèrement supérieur à N/10 puisqu'il a fallu moins de 10 ml de solution

-Titre exact de la solution de NO₃Ag :

$$\frac{N}{10} \times \frac{10}{9,9} = \frac{N}{10} \times 1,010$$

SOLUTION DE CHROMATE DE POTASSIUM AU 1/10.

Matériel : - une boîte de pétri - une spatule - une balance - une fiole jaugée de 100 ml avec bouchon - un entonnoir - une pissette pour eau déminéralisée ou distillée.

Produits chimiques :

- chromate de potassium R.P. pour analyses -
- eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- 10 grammes de chromate de K étendus d'eau jusqu'à 100 ml.

Utilisation : sert d'indicateur coloré pour le titrage précis d'une solution de NO_3Ag N/10 par référence à une solution de HCl de titre connu (par exemple HCl N/10 titré exactement).

De coloration jaune en présence de HCl au début de la réaction, donne une coloration rose persistante du précipité à la première goutte d'excès de NO_3Ag .

SOLUTION DE SULFOCYANURE DE POTASSIUM N/10.
(ou thyocyanate)

Poids moléculaire de SCNK :

$$32 + 12 + 14 + 39 = 97 \text{ g}$$

Une solution N/10 doit contenir 9,7g de sulfocyanure de potassium par litre. Ce produit étant imprégné d'eau dans les conditions ordinaires, il conviendra d'en peser 11g, tel qu'il se présente, pour avoir environ 9,7 g de SCNK pur.

Matériel : une balance - une boîte de pétri - une spatule - une pipette de 10 ml - une pissette à eau déminéralisée ou distillée - une éprouvette de 500 ml - un entonnoir - une fiole jaugée de 1 litre.

Produits chimiques :

- alcool isoamylique (Prolabo) -
- sulfocyanure de potassium R.P. (Prolabo) -
- eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- peser dans la boîte de pétri 11g de sulfocyanure de potassium
- le verser dans la fiole jaugée de 1 litre au-dessus de l'entonnoir
- bien rincer la boîte de pétri et l'entonnoir avec de l'eau distillée ou déminéralisée (pissette) pour entraîner tout le sulfocyanure dans la fiole
- ajouter 500 ml d'eau déminéralisée ou distillée
- agiter jusqu'à complète dissolution
- ajouter 10 ml d'alcool isoamylique (pour la conservation du produit).

- compléter jusqu'à 1000 ml (trait de jauge) avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

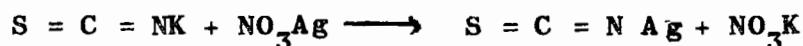
La concentration de cette solution est voisine de N/10. Il conviendra d'en préciser exactement le titre.

Utilisation : cette solution, une fois que son titre est précisé rigoureusement sert à doser l'excès de nitrate d'argent dans le dosage du ClNa.

TITRAGE VOLUMETRIQUE D'UNE SOLUTION SULFOCYANURE DE POTASSIUM.

(au moyen d'une solution nitrate d'argent rigoureusement titrée).

Principe. En présence de sulfocyanure de potassium et en milieu nitrique, le nitrate d'argent donne du sulfocyanure d'argent qui précipite :



On repère la fin de la réaction grâce à une solution d'alun de fer et d'ammonium : la couleur du liquide de jaune paille devient rougeâtre et persistante dès la première goutte d'excès de sulfocyanure.

Matériel : - une burette pour sulfocyanure de K à titrer - un becher de 150 ml - un agitateur magnétique - une pipette jaugée de 10 ml - une pipette de 5 ml - une pipette de 10 ml - une éprouvette de 100 ml.

Produits chimiques :

- NO₃Ag N/10 rigoureusement titré- sulfocyanure de potassium à titrer, voisin de N/10 - solution saturée d'alun de fer et de potassium - NO₃H - eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- mettre la solution de sulfocyanure à titrer dans la burette
- dans le becher placer successivement
 - .. 10 ml de la solution de NO₃Ag N/10 rigoureusement titré
 - .. 5 ml d'alun de fer et d'ammonium en solution saturée
 - .. NO₃H goutte à goutte jusqu'à disparition de la teinte rouille de l'alun ferrique
 - .. 100 ml d'eau distillée ou déminéralisée
- verser goutte à goutte le sulfocyanure jusqu'à ce qu'apparaisse la teinte rougeâtre persistante.

Exemple : La réaction est obtenue avec 9,2 ml de solution de SCNK et le titre du nitrate d'argent utilisé est :

$$\frac{N}{10} \times 1,01$$

le titre de la solution de SCNK est supérieur à $\frac{N}{10}$

$$10 \times \frac{N}{10} \times 1,01 = 9,2 \times \frac{N}{10} \times X$$

$$10,10 = 9,2 X$$

$$X = \frac{10,10}{9,2} = 1,098$$

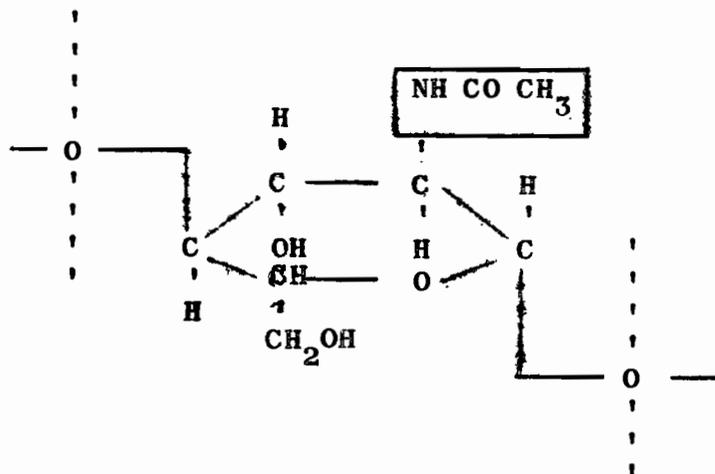
titre du sulfocyanure: $N/10 \times 1,098$

1.5. DOSAGE DE CHITINE..

(sur une farine de crevettes ou un homogénat de crevettes séchées.).

Principe. La formule chimique de la chitine est très voisine de celle de la cellulose.

Chitine



Le groupement $NH CO CH_3$ remplace dans la chitine un groupement OH de la cellulose.

Les propriétés chimiques de la chitine rappellent celles de la cellulose : elle est insoluble dans l'acide chlorhydrique dilué et dans la soude diluée, elle est insoluble dans l'eau, l'alcool et les solvants des graisses.

Ces propriétés nous ont conduit à faire une estimation de

la teneur en chitine calquée sur celle de la cellulose.

La substance réduite en poudre est soumise successivement à une hydrolyse acide puis une hydrolyse basique destinées à solubiliser les protéines et certains minéraux. On rince à l'eau on dégraisse à l'aide d'un solvant des lipides, on filtre au dessus d'un filtre sans cendres taré. Le poids de la substance recueillie correspond à celui de la chitine plus quelques minéraux qui n'ont pas été entraînés par les opérations antérieures, L'incinération de l'ensemble permet d'évaluer la quantité de minéraux restants et d'en déduire par différence la quantité de chitine.

Matériel : - une balance de précision - un verre de montre - une spatule - une éprouvette de 50 ml - un matras de Kjeldahl - deux petits billes de verre - un erlen de 200 ml - un minuteur - une centrifugeuse avec des tubes de 50 à 100 ml - un compte gouttes - une rampe à gaz - un filtre sans cendres préalablement numéroté séché et taré (diamètre 9 cm, Durieux III) - un petit entonnoir - une pince à bout courbe - une étuve à 105°C - un dessiccateur - un creuset en silice (diamètre 35 mm) - un triangle en terre de pipe (dimensions intérieures 60 mm) - un four à moufle - un interrupteur à minuterie (coupant) - une trompe à vide ou pompe à vide avec moyen de réglage.

Produits chimiques :

SO_4H_2 1,25 % - eau distillée ou déminéralisée - bleu de bromothymol à 0,02 % dans l'alcool - NaOH 2,50 % - papier pH de 1 à 10 - solvant méthylal/méthanol.

Mode opératoire :

- on pèse au 5/100e de mg près une quantité de substance voisine de 1 g dans le verre de montre.

Hydrolyse acide :

- on verse intégralement la substance dans un matras de Kjeldahl, en rinçant le verre de montre avec 50 ml (éprouvette) de SO_4H_2 à 1,25 % déjà chauffé dans un erlen
- on ajoute 2 billes de verre
- on porte à l'ébullition douce que l'on maintient pendant 30 minutes en agitant fréquemment et en surveillant. Il s'agit d'éviter qu'il n'y ait trop de mousse qui fasse déborder la substance
- puis on laisse sédimenter le contenu du matras: le mélange acide se sépare en un dépôt qui contient la chitine et un surnageant à éliminer.

Neutralisation et rinçage :

- sur un tube de centrifugeuse, on repère le niveau de 50 ml et on le marque au besoin avec un crayon feutre

- on transvase le surnageant dans ce tube et on ajuste au niveau de 50 ml avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Elimination de la plus grande partie du liquide d'hydrolyse par centrifugation.

- on centrifuge pendant 4 minutes environ pour conserver au fond du tube les particules solides qui y ont été entraînées, parmi lesquelles se trouve la chitine. On jette le surnageant.

Neutralisation dans le matras :

- on ajoute 50 ml d'eau distillée ou déminéralisée au dépôt restant dans le matras et 10 gouttes de solution de bleu de bromothymol: le liquide devient jaune (milieu acide)
- ajouter à la pipette quelques gouttes de NaOH 2,50 % jusqu'à ce que la coloration devienne verte (neutralisation du reste de SO_4H_2).

Neutralisation dans le tube :

- dans le tube de la centrifugeuse, ajouter quelques ml d'eau au culot de centrifugation, agiter, mettre trois gouttes de bleu de bromothymol la coloration devient jaune (résidu de SO_4H_2) ajouter goutte à goutte de la soude jusqu'à ce que le liquide devienne vert (neutralisation de SO_4H_2 par NaOH).
- De cette façon on a dans le tube et dans le matras un milieu neutre contenant en suspension la chitine et d'autres particules (qui seront éliminées dans les opérations d'hydrolyse basique et suivantes).

Rinçage :

- on transvase intégralement, en une ou plusieurs fois le contenu du matras dans le tube de centrifugeuse en prenant soin de ne pas dépasser le niveau 50 ml (ou bien d'ajuster au niveau 50 ml)
- on centrifuge et on se débarrasse du surnageant (en une ou plusieurs fois)
- à la dernière opération, on vérifie avec le papier pH que le milieu est bien neutre s'il n'est pas neutre, on ajoute encore de l'eau distillée ou déminéralisée dans le tube de centrifugeuse et on rince encore
- à la fin, on a le culot de centrifugation qui contient entre autres choses la chitine.

Hydrolyse basique :

- on transvase ce culot intégralement dans le matras libéré antérieurement, avec 25 ml d'eau distillée ou déminéralisée
- puis on ajoute 25 ml de NaOH 2,50 %
- on porte à ébullition douce que l'on maintient pendant

- 30 minutes en surveillant attentivement
- on laisse reposer ensuite le matras ; le mélange basique se sépare en un dépôt qui contient la chitine, et un surnageant à éliminer.

Neutralisation et rinçage :

- on procède comme antérieurement pour éliminer la plus grande partie du liquide (basique cette fois) et neutraliser (avec du SO_4H_2 1,25 %, le colorant bleu de bromothymol passant du 4^2 bleu au vert). Les opérations sont analogues à celles qui suivent l'hydrolyse acide antérieure. (Voir élimination de la plus grande partie du liquide d'hydrolyse par centrifugation, neutralisation dans le matras et dans le tube, rinçage).
- à la fin, on a dans le tube de centrifugeuse un culot contenant la chitine; quelques savons dûs à l'action de la soude sur les lipides et quelques sels minéraux, dans un milieu neutre, avec 2 billes de verre.

Filtration et dégraissage :

- on renverse le tout au-dessus du filtre sans cendres taré, plié, sur un entonnoir au-dessus d'un erlen à vide
- on rince d'abord à l'eau, puis avec le solvant en s'aidant d'un léger vide (si l'aspiration est trop forte, le filtre se crève)
- quand l'opération est terminée, on a dans le filtre la chitine et quelques résidus minéraux.

Séchage :

- on fait sécher le filtre 6 heures à 105°C
- puis on le met 3 heures au moins dans un dessiccateur
- on le pèse
- on évalue ainsi la quantité "chitine + minéraux".

Estimation des minéraux :

- on pèse un creuset en silice sec
- on place à l'intérieur le filtre et son contenu
- on incinère à l'air libre en le plaçant sur le triangle en terre de pipe
- puis on incinère 3 heures à 550°C (four à moufle, Coupatan)
- lorsque le four est refroidi, on retire le creuset et on le place 1 heure à 105°C (étuve)
- puis 3 heures dans le dessiccateur
- on le pèse.

On évalue ainsi la quantité de minéraux mélangé à la chitine, puis la quantité de chitine seule.

Calculs : On a les poids suivants :

- verre de montre vide
- verre de montre + farine
- filtre sec vide

- filtre sec + chitine + minéraux
- creuset en silice sec vide
- creuset en silice sec + minéraux.

On en déduit :

- le poids de la farine
- le poids de "chitine + minéraux" correspondant
- le poids de minéraux correspondant
- le poids de chitine correspondant
- le pourcentage de chitine.

Exemple. Dosage de chitine dans une farine de têtes de crevettes :

- verre de montre avec farine : 11,13565 g
- verre de montre vide : 10,13000 g
- poids de farine : 1,00565 g

- papier filtre + chitine + minéraux = 0,53500 g
- papier filtre seul = 0,42535 g
- poids de chitine + minéraux = 0,10965 g

- creuset + résidu minéral = 12,88585 g
- creuset vide = 12,86990 g
- poids des minéraux = 0,01595 g

- poids de chitine seule = 0,09370 g
- pourcentage de chitine
$$\frac{0,09370 \times 100}{1,00565} = 9,32 \%$$

SOLUTION DE SO_4H_2 1,25 % (environ).

- On dispose de SO_4H_2 R.P. (Prolabo) à 95%, de densité $d = 1,83$
- On veut avoir 12,5 grammes de SO_4H_2 pur par litre
- Ces 12,5 grammes sont contenus dans un poids de SO_4H_2 égal à $12,5 : 0,95 = 13,158 \text{ g}$
- Soit dans un volume de $13,158 : 1,83 = 7,2 \text{ ml}$ de SO_4H_2 R.P..

Matériel : - une pipette graduée de 10 ml - une propipette - une fiole jaugée de 1 litre.

Produits chimiques :

- SO_4H_2 R.P. (Prolabo) - eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- mettre un peu d'eau distillée ou déminéralisée au fond de la fiole jaugée
- y verser ensuite avec la pipette et propipette 7,2 ml de SO_4H_2 R.P., agiter, le mélange s'échauffe
- laisser refroidir

- ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Utilisation : cette solution est utilisée pour l'hydrolyse acide précédant la séparation de la chitine.

SOLUTION DE NaOH 2,50 % (environ).

Matériel : - une fiole jaugée de 1 litre - une boîte de pétri - une spatule - une balance - un becher de 150 ml - une pissette à eau déminéralisée ou distillée - un entonnoir - un petit agitateur en verre. :

Produits chimiques :

- soude caustique en pastilles R.P. (Prolabo) -
- eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- peser le plus rapidement possible 25 grammes de soude en pastilles dans la boîte de pétri
- verser les pastilles dans le becher et rincer la boîte de pétri au-dessus du becher avec la pissette à eau
- ajouter encore de l'eau dans le becher
- agiter le mélange avec l'agitateur: le mélange s'échauffe
- verser dans la fiole jaugée de 1 litre surmontée d'un entonnoir, tout le contenu de becher
- rincer à l'eau le becher et l'entonnoir
- ajouter de l'eau jusqu'à la moitié du flacon
- laisser refroidir
- ajuster au trait de jauge avec de l'eau.

Utilisation : cette solution est utilisée pour l'hydrolyse basique précédant la séparation de la chitine.

SOLUTION DE BLEU DE BROMOTHYMOLOXINE :
(à 0,02 % (environ) dans l'alcool).

Matériel : - un verre de montre - une spatule - une balance de précision - une éprouvette de 100 ml - un flacon de 100 ml - un petit entonnoir.

Produits chimiques :

- bleu de bromothymol (poudre jaune) -
- alcool à 95°

Mode opératoire :

- peser dans le verre de montre environ 0,02g de bleu de bromothymol
- préparer dans l'éprouvette 100 ml d'alcool
- verser dans le flacon surmonté d'un entonnoir le bleu de bromothymol en rinçant le verre de montre et l'entonnoir avec les 100 ml d'alcool.

Utilisation : cette solution est utilisée comme indicateur coloré pour suivre les neutralisations après les hydrolyses acide et basique au cours d'évaluation de la chitine.
Ce colorant est jaune au pH = 6, bleu au pH = 7,6 et vert au pH = 7.

MELANGE METHYLAL-METHANOL (4V - 1V).

Matériel : - une éprouvette de 1 litre - une éprouvette de 250 ml - un flacon propre et bien bouché (bouchon recouvert d'une feuille d'aluminium) de 1600 ml - un entonnoir.

Produits chimiques :

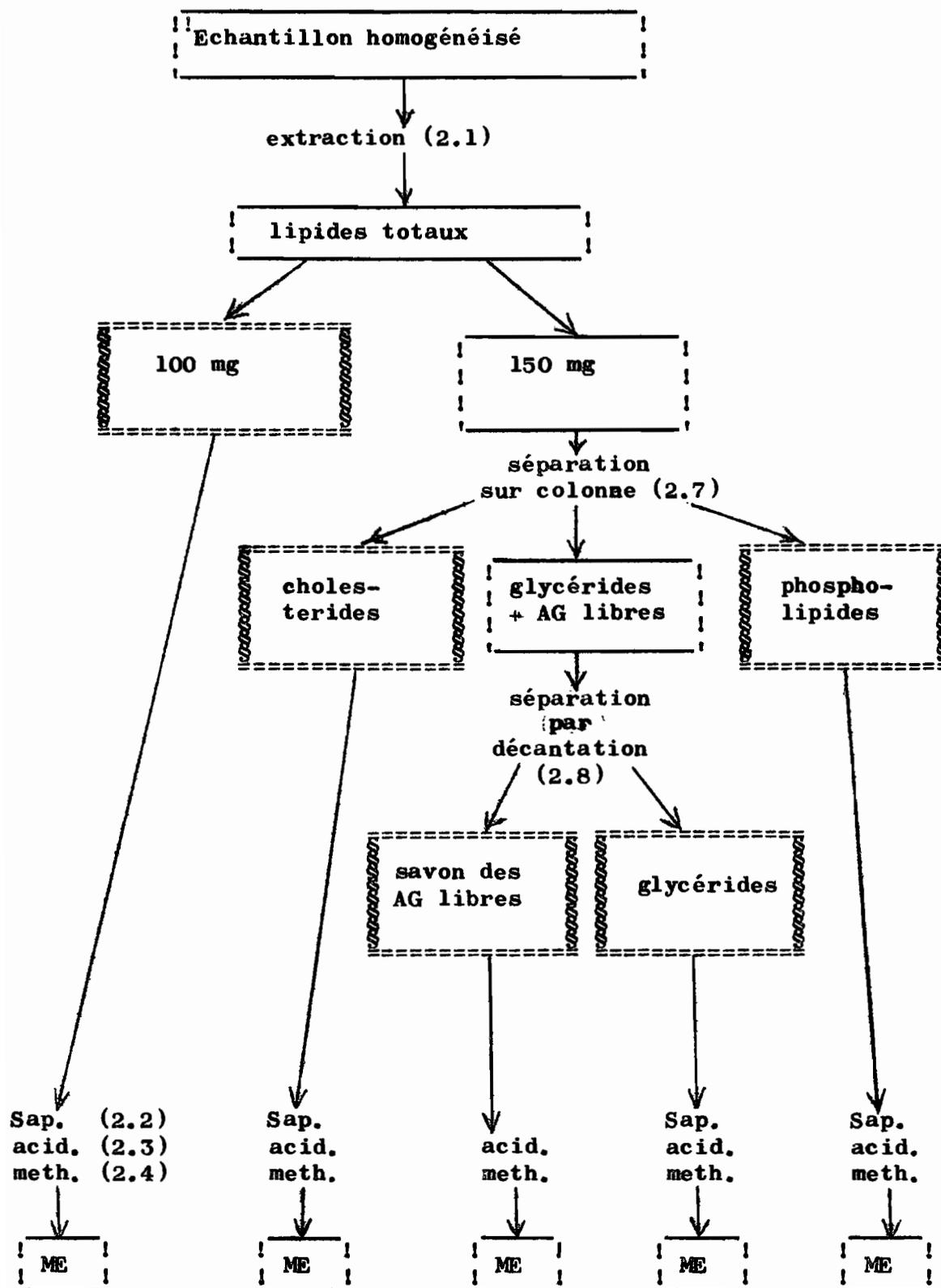
- méthylal pur (Prolabo) purifié par distillation au laboratoire
- alcool méthylique R.P. pour analyses (Prolabo) (méthanol).

Mode opératoire :

- mettre dans la grande éprouvette un litre de méthylal (déjà purifié par distillation au laboratoire)
- mettre dans la petite éprouvette 250 ml d'alcool méthylique
- verser le tout dans le flacon propre, à l'aide de l'entonnoir
- bien boucher.

Utilisation : -sert à délipider les résidus d'hydrolyse pour l'évaluation de la chitine.
-sert également pour l'extraction des lipides selon la technique de Delsal, voir deuxième partie d'étude des lipides.

ETUDES DES LIPIDES.



II. ETUDES DES LIPIDES.

2.1. EXTRACTION A FROID DES LIPIDES TOTAUX.

Principe. L'échantillon est broyé à froid en fines particules dans un mélange de solvants. On filtre le tout sur verre fritté pour éliminer les particules. On évapore sous vide le solvant du filtrat, ainsi que l'eau qui a été entraînée au cours de l'extraction et on reprend les lipides en solution dans le chloroforme.

Matériel :

- une balance de précision - un broyeur ménager (type Tornado, trois couteaux inférieurs au bout d'une tige de 13 cm, surmontée d'un moteur) - un récipient métallique, forme haute (nous avons utilisé un récipient à lait en poudre Guigoz : hauteur 15 cm, diamètre 8,5 cm) - trois ballons de verre de 500 ml munis de pissettes pour les solvants - un filtre en verre fritté : diamètre 7 cm, porosité 3 (Prolabo) - une fiole à vide - une trompe à vide ou une pompe à vide - un entonnoir - un ballon de 250 ml avec son bouchon de verre -
- une fiole jaugée de 50 ml - un filtre amiante sable (voir préparation d'un filtre amiante sable), avec son support - une éprouvette de 100 ml - une feuille d'aluminium - un scalpel -
- un mortier avec pilon - une spatule - une bouilloire électrique de 1 litre avec thermostat - un support à plateau à hauteur variable.

Produits chimiques : dans des pissettes en verre :

- solution de méthylal-méthanol (voir mélange méthylal-méthanol)
- alcool éthylique absolu R.P. pour analyses (Prolabo)
- chloroforme R.P. pour analyses (Prolabo).

Mode opératoire :

- préparer 200 ml de méthylal-méthanol
- peser exactement 10 g de matière fraîche sur une feuille d'aluminium préalablement rincée au méthylal-méthanol, séchée à l'air libre et tarée
- placer tout l'échantillon dans le récipient de métal en rinçant la feuille d'aluminium avec une partie du mélange méthylal-méthanol déjà préparée
- ajouter le reste de méthylal-méthanol
- broyer pendant 3 minutes en tout avec le broyeur ménager, en s'y prenant à plusieurs reprises (éviter les projections)
- laisser ensuite reposer 15 minutes
- placer le filtre en verre fritté sur la fiole à vide ; filtrer le contenu du récipient en métal en faisant le vide
- rincer le récipient en métal avec du solvant et ajouter sur le filtre le liquide de rinçage
- rincer le dépôt qui recouvre le verre fritté
- peser un ballon de 250 ml propre et sec
- transvaser le contenu de la fiole à vide dans ce ballon
- évaporer le solvant sous vide avec l'évaporateur rotatif (voir évaporation avec évaporateur rotatif)

- il reste un résidu aqueux et les lipides
- entraîner l'eau en ajoutant de l'alcool absolu
- (cette opération est parfois délicate lorsque le contenu du ballon a tendance à mousser. Il faut alors surveiller attentivement pour que des lipides ne soit entraînés au delà du goulot du ballon)
- à la fin, il reste au fond du ballon les lipides de l'échantillon légèrement dilués par un peu de solvant., l'ensemble a un aspect huileux
- on laisse refroidir le ballon et son contenu et on pèse pour avoir l'estimation de l'ordre de grandeur maximum de la quantité de lipides (voir calculs)
- on ajoute dans le ballon environ 20 ml de chloroforme et on agite en tournant, afin de diluer les lipides
- on filtre sur filtre amiante sable à chloroforme (voir filtre amiante sable), au-dessus d'une fiole jaugée de 50 ml. On prend bien soin de rincer le ballon au chloroforme au-dessus du filtre et de rincer le filtre lui-même
- on ajuste le contenu de la fiole jaugée à 50 ml et on bouche
- on dispose alors des lipides totaux de l'échantillon initial en solution dans le chloroforme. On en calcule la concentration maximale en lipides. Cette solution servira de matière première aux opérations suivantes : (voir 2.2 et 2.7).
- on place l'extrait au réfrigérateur à 5°C.

Calculs.

- Il ne s'agit pas ici de dosage, mais d'estimation d'un ordre de grandeur supérieur. En effet, le poids des matières contenu dans le ballon de 250 ml est le poids des lipides majoré par le poids (inconnu) des traces de solvants qui y restent intimement mélangés. Cette donnée ne peut pas servir pour un vrai dosage, mais elle permet d'estimer l'ordre de grandeur de la concentration de la solution lipidique finale, la concentration vraie qui est inconnue lui étant toujours inférieure. Cet ordre de grandeur est utile pour les opérations suivantes (voir 2.2. et 2.7.).
- on dispose des données suivantes :
 - le poids de la feuille d'aluminium seule
 - le poids de la feuille d'aluminium et l'échantillon qu'elle contient
 - le poids du ballon de 250 ml vide
 - le poids du même ballon contenant les lipides totaux (plus un résidu de solvant).
- on en déduit :
 - le poids de l'échantillon
 - l'évaluation (majorée) de la quantité de lipides disponibles
 - l'estimation majorée du pourcentage de lipides
 - l'estimation majorée de la concentration en lipides de la solution chloroformique.

Exemple : exemple numérique concernant du muscle de poisson frais broyé au mortier

- feuille d'aluminium : 0,21070 g

- feuille d'aluminium contenant l'échantillon : 10,82715 g
- ballon vide : 90,04925 g
- ballon avec lipides et résidu de solvant : 90,36275 g
- poids de l'échantillon :
 $10,82715 - 0,21070 = 10,61645 \text{ g}$
- poids des lipides et du résidu de solvant :
 $90,36275 \text{ g} - 90,04925 \text{ g} = 0,36275 \text{ g}$ ou 362,75 mg
- ordre de grandeur de la concentration en lipides de l'extrait chloroformique de 50 ml :
 $\frac{362,75 \text{ mg}}{50} = 7,25 \text{ mg par ml}$

Ce qui signifie que la concentration en lipides est inférieure à 7,25 mg/ml.

SOLUTION METHYLAL-METHANOL. :

(se reporter au dosage de la chitine lère partie p. 52).

DISTILLATION DES SOLVANTS.

(méthylal - ether de pétrole - pentane).

Cette distillation est nécessaire pour trois produits qui ne sont pas vendus dans le commerce sous l'appellation "R.P., pour analyses".

Il s'agit de :

- méthylal pur
 - éther de pétrole (40-65°)
 - pentane technique.
- } Prolabo

Principe. Le solvant à distiller est évaporé par chauffage, les vapeurs sont condensées au contact d'un système réfrigérant, des impuretés restent au fond du ballon soumis au chauffage.

Matériel : - appareil à distiller

- dans notre cas, nous avons utilisé le montage de l'évaporateur rotatif (partie en verre et bloc moteur, voir dessin), sans y faire le vide
- bouilloire à rhéostat servant de bain-marie
- support à hauteur réglable
- bonbonnes bien propres et bien bouchées (avec des bouchons entourés de feuille d'aluminium propre) pour recueillir les produits distillés.

Manipulation et fonctionnement :

- le ballon A qui contient le liquide à purifier est animé

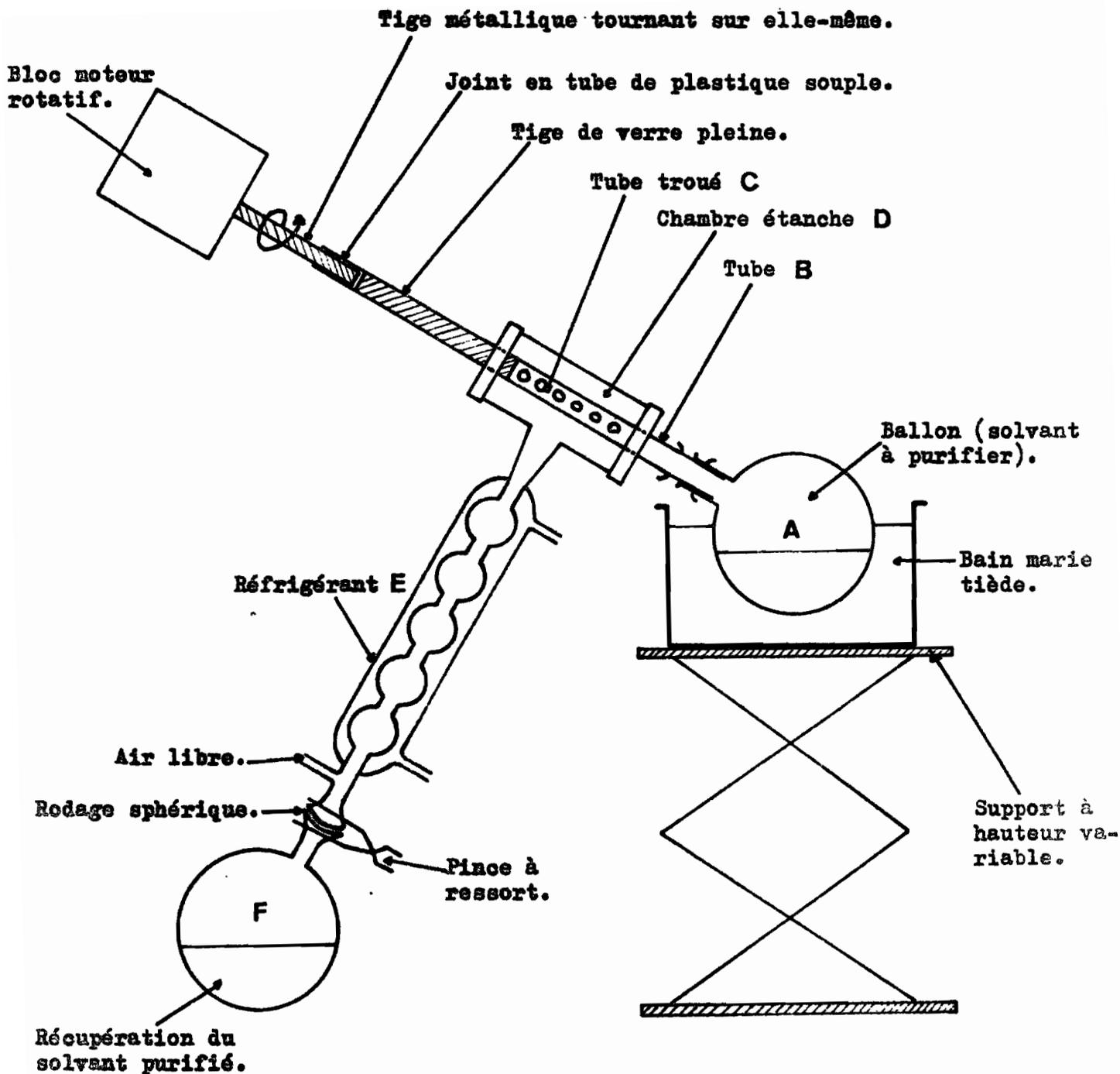


Fig. 5 - Schéma de montage pour la distillation des solvants.

d'un mouvement rotatif lent. La tige métallique sortant du bloc moteur l'entraîne dans son mouvement par l'intermédiaire d'un joint souple, d'une tige de verre pleine et d'un tube de verre qui la prolonge (B)

- les vapeurs issues du ballon A passent dans le tube B. Elles s'échappent de ce tube par les orifices du tube C qui le prolonge. Les vapeurs se répandent dans la chambre étanche D est sont ensuite au contact du système réfrigérant. Les vapeurs se condensent alors et sont recueillies dans le ballon E
- lorsque la majeure partie du solvant à purifier a été évaporée, on constate dans le ballon A la présence d'un résidu jaunâtre que l'on jette
- le contenu du ballon E, constitué de solvant purifié est versé dans les bonbonnes.

Remarque. La température étant particulièrement élevée à Nosy-Bé, nous avons augmenté le rendement de l'opération en refroidissant l'eau alimentant le réfrigérant. On la fait passer au préalable dans un serpentín de cuivre, présentant une large surface de contact avec de l'eau refroidie par de la glace. Ce mélange froid est placé dans un récipient cylindrique muni d'un trop plein et placé dans un évier. Il est alimenté en glace au fur et à mesure des besoins.

EVAPORATION DES SOLVANTS ET D'EAU. : (avec l'évaporateur rotatif),

On dispose d'un échantillon lipidique en solution dans un solvant ou un mélange de solvants. Cette solution peut, en outre contenir une certaine quantité d'eau. Le but de l'opération est d'obtenir les lipides purs (ou presque, puisque une petite quantité de solvant y reste mêlée). Il faut donc éliminer les solvants et l'eau.

Principe. Les solvants sont évaporés à la fois par un chauffage léger au bain-marie (température 50°C) et par la dépression obtenue au moyen d'une trompe à eau ou d'une pompe à vide (exemple : pompe Segal type B 35 MKR, Prolabo). L'eau restante est entraînée par la même opération après addition d'alcool éthylique absolu (10 à 20 ml une ou plusieurs fois).

Matériel : - un ballon contenant la solution lipidique initiale.
- un évaporateur rotatif complet comprenant :

- .. une bouilloire de 1 litre avec thermostat, servant de bain-marie (T°C 50°C)
- .. un support plat à hauteur variable
- .. une trompe à eau ou une pompe à vide avec tuyaux d'évacuation des vapeurs
- .. un manomètre

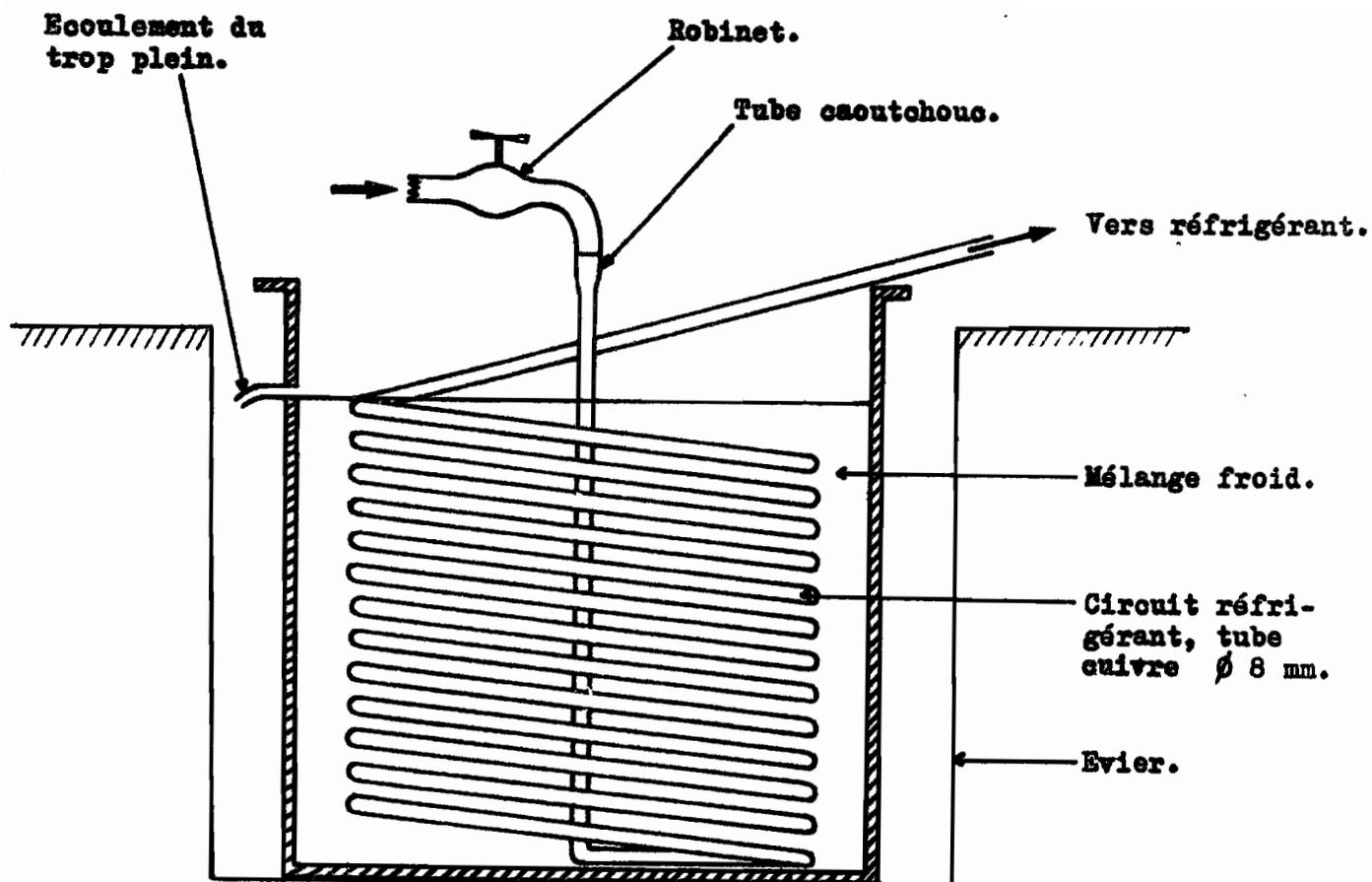


Fig. 6 - Schéma du montage pour la réfrigération de l'eau.

- .. un robinet à pointeau pour réglage du vide
- .. un piège à solvants condensés constitué d'un erlen à vide en communication avec le vide par un tube de verre (voir le dessin du montage).

Mode opératoire :

- on monte le ballon contenant la solution lipidique sur la partie en verre de l'évaporateur rotatif (voir distillation des solvants)
- on met en marche le système à vide
- on règle le vide avec le robinet à pointeau et le manomètre.

Pour l'éther éthylique et le pentane, il suffit d'un vide léger (100 mm) pour l'alcool éthylique et l'alcool méthylique, le vide doit-être plus poussé (500 à 750 mm).

- on ajuste la hauteur du bain-marie tiède de telle sorte que le ballon A y soit plongé (support à hauteur réglable)
- à la température où nous travaillons (24 à 28°C) les solvants à éliminer se condensent dans les pièges (ballon F et erlen G) s'ils ont un point d'ébullition élevé (exemple alcool éthylique 78°C, alcool méthylique 64°C). Ils partent sous forme de vapeur si la température d'ébullition est basse (pentane et éther éthylique 35°C)
- quand il reste au fond du ballon A une substance huileuse l'opération est terminée
- on reprend alors immédiatement ces lipides en solution avec le solvant utile pour l'opération suivante (variable selon les cas).

PREPARATION D'UN FILTRE AMIANTE-SABLE.

Matériel : - un entonnoir special dit "allonge-entonnoir" pour creuset filtrant de 30 ou de 50 ml (Prolabo) - un erlen de 200 ml à tubulure étroite - une pissette en verre pour HCl 4 N - une pissette en verre pour alcool absolu - une pissette en verre pour éther éthylique - une pissette en plastique pour eau déminéralisée ou distillée - une étuve à circulation d'air - un petit agitateur - une pince - une spatule - un tube à essai - un support pour placer le filtre amiante sable debout.

Produits chimiques :

- sable de Fontainebleau lavé aux acides - fibre d'amiante -
- coton de verre - HCl 4N environ - eau distillée ou déminéralisée - alcool éthylique - éther éthylique - papier pH (de 1 à 10) - toluène.

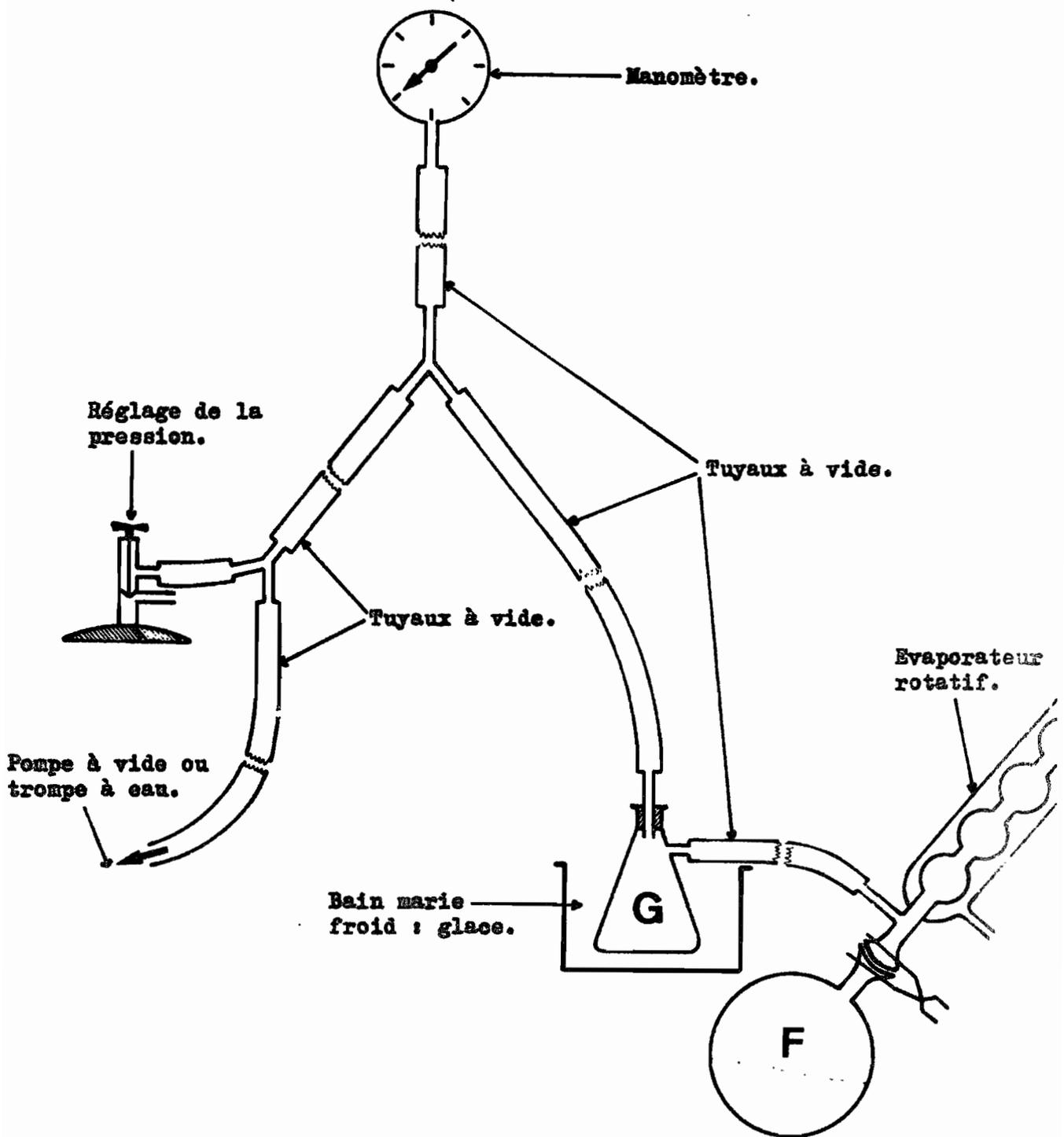


Fig. 7 - Schéma du raccord de l'évaporateur rotatif à la pompe à vide.

Mode opératoire :

1) confection:

suivre le schéma.

2) lavage du filtre:

- placer le filtre au-dessus de l'erlen
- verser à la pissette de l'acide chlorhydrique 4 N, ce qui donne un filtrat rouge (sauf dans les cas où sable, fibre d'amiante et coton de verre sont déjà purifiés)
- ajouter HCl jusqu'à ce que le filtrat soit incolore
- jeter ce filtrat chlorhydrique
- rincer avec de l'eau distillée ou déminéralisée jusqu'à neutralité en vérifiant avec du papier pH
- rincer avec de l'alcool absolu. Ce rinçage à l'alcool entraîne le résidu d'eau du rinçage précédent
- on vérifie que le filtrat alcoolique est bien sec par le test au toluène, avec le tube à essai (voir test au toluène)
- rincer avec de l'éther éthylique
- sécher à l'étuve à 50°C en plaçant le filtre amiante sable debout sur un support
- le filtre ainsi préparé est prêt à l'usage.

Utilisation : sert à débarrasser les solutions de lipides dans divers solvants des impuretés non solubles qu'elles peuvent contenir, telles que débris organiques insolubles, sulfate de soude en poudre, poudre d'acide silicique par exemple. Lorsque les lipides sont en solution dans le chloroforme on utilise un filtre amiante-sable marqué "chloroforme". Si le solvant est du pentane, on utilise un filtre amiante-sable marqué "pentane", etc...
A la fin de chaque opération de filtration on rince ce genre de filtre avec le solvant qui lui est attribué. Avant utilisation, on l'imbibé avec le solvant.

SOLUTION DE HCl 4 N (environ).

Matériel : -- une éprouvette de 250 ml - une éprouvette de 1 litre - un ballon pyrex de 2 litres pour la préparation - un crayon feutre - un entonnoir - une bouteille de 1 litre pour le rangement, avec un bouchon de plastique.

Produits chimiques :

- HCl R.P. pour analyses (Prolabo) (voisin de 12 N)
- eau déminéralisée ou distillée.

Mode opératoire :

- remplir la grande éprouvette avec 1 litre d'eau déminéralisée ou distillée
- verser cette eau dans le ballon en pyrex de 2 litres
- marquer au passage les niveaux de 250 ml et de 750 ml avec

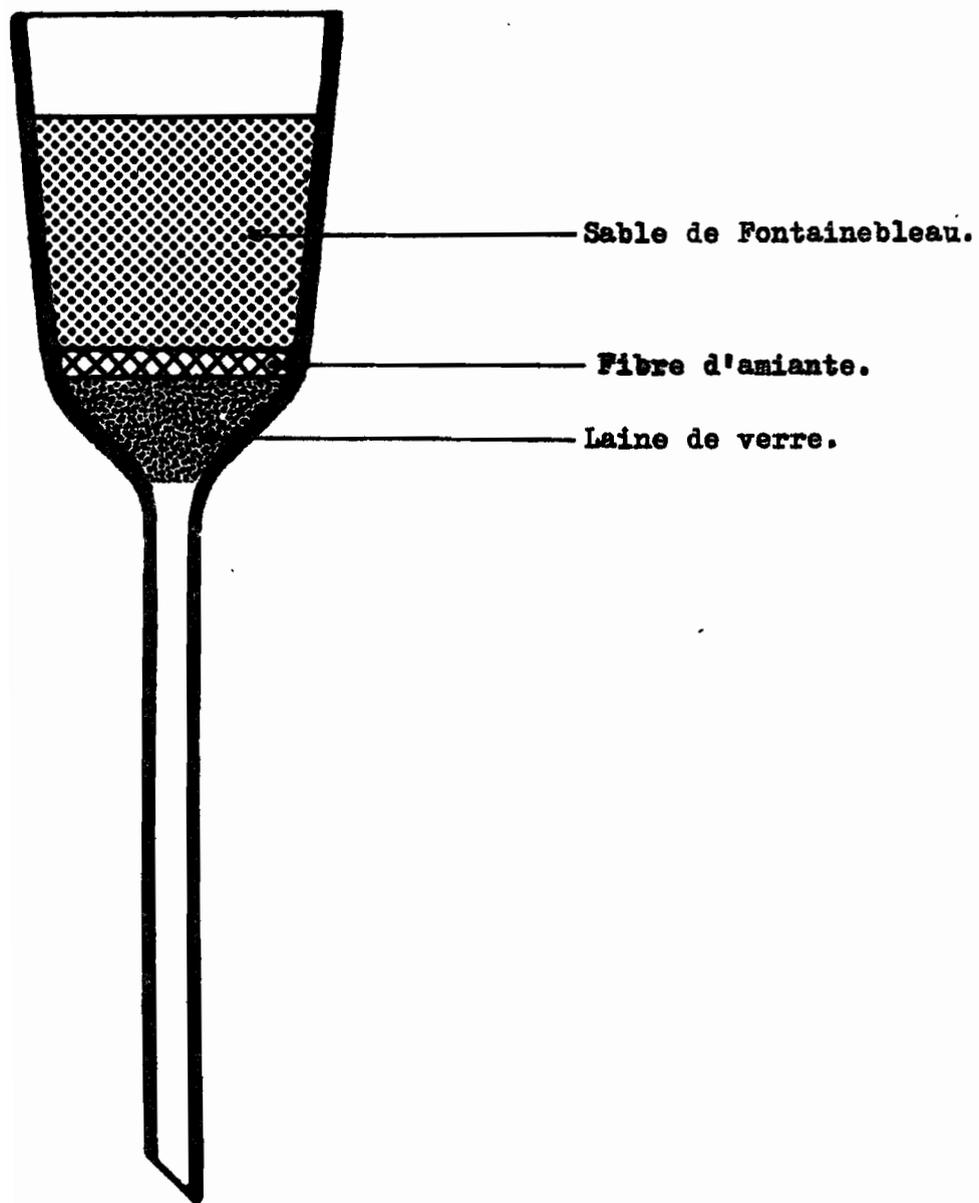


Fig. 8 - Filtre amiante-sable.

le crayon feutre

- reverser une partie de cette eau déminéralisée ou distillée dans la grande éprouvette en laissant 250 ml d'eau environ dans le ballon
- verser 250 ml de HCl R.P. dans la petite éprouvette
- verser ensuite doucement et en agitant cet HCl R.P. dans le ballon, en agitant. Le liquide s'échauffe
- laisser refroidir le mélange dans le ballon
- ajuster à 750 ml (au trait)
- transvaser dans la bouteille de 1 litre pour le rangement, bien boucher.

Utilisation : -Sert à laver le filtre amiante sable au moment de sa préparation.
-Sert à acidifier le milieu après saponification.

TEST AU TOLUENE.

(Vérification de la présence d'eau dans de l'alcool éthylique).

Matériel : - un tube à essai.

Produits chimiques :

- toluène pur (Prolabo)
- alcool éthylique absolu R.P. pour analyses (Prolabo)
- eau ou alcool hydraté.

Test avec l'alcool absolu (c'est-à-dire ne contenant pas d'eau)

dans un tube à essai, un mélange de toluène et l'alcool absolu est limpide et incolore après agitation.

Test en présence d'eau

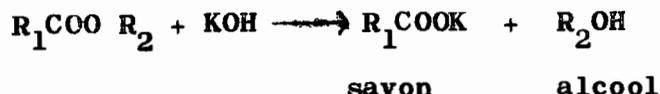
- une goutte d'eau ajoutée au mélange précédent donne après agitation un liquide trouble, blanchâtre, d'aspect laiteux
- de l'alcool éthylique partiellement hydraté donne en présence de toluène un mélange d'aspect laiteux.

Utilisation : sert à vérifier le degré de séchage par l'alcool absolu dans la préparation des filtres "amiante-sable".

2.2. SAPONIFICATION A CHAUD. (des lipides totaux).

Principe. On fait agir à chaud une base forte (KOH) sur les lipides. Les

acides gras des lipides se combinent à la potasse pour donner des savons. La réaction est totale :



Matériel : - un ballon de 50 ml avec bouchon de verre (rodage 24 x 29) - deux pipettes de 10 ml graduées - un évaporateur rotatif complet - une surface chauffante isolée par de l'amiante (isomantle) avec un rheostat - un réfrigérant à air (rodage 24 x 29) - un interrupteur à minuterie (Coupatan) - un système pour maintenir sur l'isomantle le ballon et son réfrigérant - pierre ponce en grains nettoyée au méthanol.

Produit-chimique :

- KOH 2N dans le méthanol.

Mode opératoire :

- on opère au départ sur l'échantillon des lipides dilués dans 50 ml de chloroforme dont on connaît l'ordre de grandeur de la concentration (voir 2.1., calculs)
- on en prélève à la pipette une quantité contenant environ 100 mg de lipides qu'on verse dans le ballon de 50 ml (voir 2.2. calculs)
- on évapore le chloroforme (évaporateur rotatif)
- * - on reprend par 10 ml de KOH 2N dans le méthanol
- on ajoute 1 ou 2 grains de pierre ponce déjà nettoyée au méthanol par une extraction au Soxhlet
- on place le réfrigérant à air sur le ballon
- on pose le ballon sur l'isomantle
- on règle le rheostat de telle sorte que le liquide soit en ébullition
- on règle le coupatan sur 3 heures
- on laisse bouillir pendant ce temps
- quand l'ébullition est terminée, on attend que le ballon refroidisse
- on retire le réfrigérant à air du ballon et on met un bouchon
- ce ballon contenant les savons de potasse des acides gras peut être mis au réfrigérateur (5°C) en attendant la manipulation ultérieure (acidification puis extraction des acides gras, voir 2.3.).

Exemple de calcul du volume extrait chloroformique à traiter :

Soit un extrait ayant une concentration lipidique de l'ordre de grandeur de 7,25 mg par ml (estimation majorée),

100 mg de lipides sont contenus dans :

100 : 7,25 = 13,8 ml de cette solution

La manipulation décrite portera sur une prise de 13 ou 14 ml.

SOLUTION DE KOH ENVIRON 2 N DANS LE METHANOL.

Matériel : - un becher de 100 ml - une spatule - une balance - une fiole jaugée de 1 litre - une cuvette pour bain-marie - un flacon - une pissette à alcool méthylique - un entonnoir - un agitateur.

Produits chimiques :

· potasse en pastilles R.P. pour analyses - alcool méthylique.

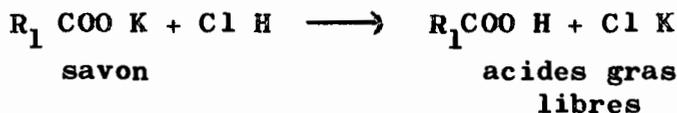
Mode opératoire :

- peser rapidement pour éviter l'hydratation du produit, 112g de KOH en pastilles dans le becher
- ajouter de l'alcool méthylique, agiter, le mélange s'échauffe
- verser le liquide dans la fiole jaugée. Rincer au méthanol
- ajouter dans cette fiole de l'alcool méthylique en continuant d'agiter
- laisser refroidir et ajuster au trait de jauge.

Utilisation : sert à faire la saponification à chaud des lipides.

2.3. ACIDIFICATION ET EXTRACTION DES ACIDES GRAS.

Principe. On libère les acides gras des savons par une addition de HCl en excès.



Les acides gras libres sont solubles dans l'éther éthylique. On les reprend par séparation dans une ampoule à décanter. Le solvant est évaporé ainsi que l'eau, on met les acides gras en solution dans le pentane, on filtre.

Matériel : - une pipette de 5 ml - un petit agitateur en verre - une éprouvette de 50 ml - une pissette à eau déminéralisée ou distillée - une pissette à éther éthylique - deux ampoules à décanter de 250 ml avec leurs bouchons - deux bechers de 400 ou 600 ml à placer sous les ampoules à décanter - un petit entonnoir (diamètre = 5,5 cm) pour les ampoules à décanter - un support pour deux ampoules à décanter - un évaporateur rotatif complet - un filtre amiante sable à pentane - un ballon de 50 ml - un réfrigérateur.

Produits chimiques :

- HCl 4 N - papier pH de 1 à 10 - eau déminéralisée ou distillée - éther éthylique R.P. - ClNa cristallisé R.P. pour analyses.

Mode opératoire :

Acidification :

- placer les deux ampoules à décanter sur le support et placer au-dessous les deux grands bechers
- on dispose du ballon qui contient les savons potassiques des acides gras, dans un excès de KOH dans le méthanol
- on ajoute 5 ml de HCl 4N avec la pipette
- on vérifie que le pH est alors aux environs de 1, avec une touche sur papier pH faite avec le petit agitateur
- si le milieu n'est pas acide, rajouter du ClH goutte à goutte jusqu'à ce qu'il soit acide.

Extraction des acides gras

1ère extraction

- transvaser dans la 1ère ampoule à décanter avec 30 ml d'eau (éprouvette) puis 30 ml d'éther
- *x - boucher, agiter plusieurs fois de suite, puis laisser échapper l'excès de pression. La solubilisation est terminée lorsqu'il n'y a plus d'excès de pression
- laisser décanter
- s'il se forme une émulsion qui gêne la décantation ajouter environ 5 g (2 spatulées) de chlorure de sodium, agiter, laisser décanter
- récupérer la phase aqueuse dans la deuxième ampoule, en laissant la phase étherée dans la première
- remettre la première ampoule sur le socle.

2ème extraction

- faire une autre extraction avec 30 ml d'éther ajouter à l'ampoule n° 2
- jeter la phase aqueuse.

Rinçages :

- transvaser la phase étherée de la 2ème ampoule dans la première
- rincer à l'éther avec une pissette, puis à l'eau (30 ml) en remettant ces liquides dans la première ampoule (l'eau est destinée à laver la solution étherée des restants d'acide chlorhydrique qu'elle peut contenir)
- on agite, on décante, on jette l'eau
- on refait un autre rinçage avec 30 ml d'eau
- on vérifie au papier pH si la 2ème eau de rinçage est encore acide
- si elle l'est, on opère un 3ème rinçage, etc.... jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit neutre (en général 2 rinçages suffisent)
- quand on a vidé cette eau, il reste dans l'ampoule la phase étherée contenant les acides gras libres en solution
- on récupère cette phase étherée dans un ballon de 250 ml en rinçant l'ampoule à décanter avec de l'éther.

Evaporation :

- on évapore l'éther à l'évaporateur rotatif.

Séchage :

- il reste un résidu aqueux que l'on évapore à l'aide d'alcool absolu jusqu'à ce qu'il reste au fond du ballon une substance huileuse (acides gras).

Reprise en solution par un autre solvant :

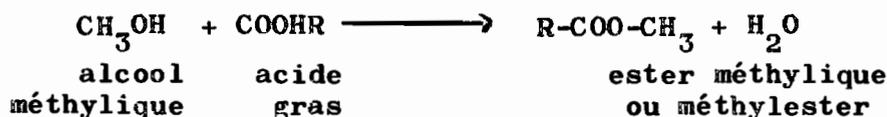
- on reprend en solution par 15 ml de pentane.

Filtration :

- on filtre sur filtre amiante sable à pentane au-dessus d'un petit ballon de 50 ml; on rince au pentane
- cette solution d'acides gras dans le pentane servira de matière première pour la méthylation
- on peut l'utiliser le lendemain. Dans ce cas placer le ballon bouché au réfrigérateur (5°C environ).

2.4. METHYLATION DES ACIDES GRAS.

Principe. Les acides gras sont chauffés dans l'alcool méthylique en excès en présence d'acide sulfurique comme catalyseur. Il se forme la réaction :



Matériel : - un ballon de 50 ml - un réfrigérant à air - un manteau chauffant (isomantle) - un interrupteur à minuterie (Coupatan) - un évaporateur rotatif complet - deux pipettes de 10 ml - un réfrigérateur - un système pour maintenir sur l'isomantle le ballon et son réfrigérant.

Produits chimiques :

- alcool méthylique R.P. pour analyses - acide sulfurique R.P. pour analyses - pierre ponce délipidée à l'alcool méthylique.

Mode opératoire :

- on dispose d'une solution d'acides gras dans le pentane
- on évapore le pentane avec l'évaporateur rotatif
- on ajoute aux acides gras qui restent au fond du ballon 10 ml d'alcool méthylique et 1 ml de SO_4H_2 R.P. (avec deux pipettes différentes)
- un ou deux grains de pierre ponce déjà nettoyée au méthanol
- on place le réfrigérant à air
- on pose sur l'isomantle
- on maintient l'ébullition pendant une heure (Coupatan)

- on attend que le ballon refroidisse, on retire le réfrigérant et on met un bouchon.
- (Ce ballon contenant des méthylesters d'acides gras peut être mis au réfrigérateur, l'extraction ultérieure ayant alors lieu le lendemain).

2.5. EXTRACTION DES METHYLESTERS.

Principe. Les méthylesters sont repris en solution par le pentane par séparation dans une ampoule à décanter. On deshydrate la solution par le sulfate de soude, on évapore l'excès de pentane et on filtre.

Matériel : deux ampoules à décanter avec bouchons (250 ml) - deux bechers de 400 ou 600 ml à placer sous les ampoules - un socle pour deux ampoules à décanter - un petit entonnoir pour les ampoules à décanter - un ballon de 250 ml - une pissette en plastique (eau distillée ou déminéralisée) - une éprouvette de 50 ml - une spatule - un compte-minutes - un réfrigérateur - un évaporateur rotatif complet - un petit entonnoir de 4,5 cm de diamètre - laine de verre - un filtre amiante-sable (pour pentane) un ballon de 50 ml - papier pH.

Produits chimiques :

- eau distillée ou déminéralisée - pentane redistillé au laboratoire - sulfate de soude sec pour analyses (Merk) - chlorure de sodium R.P. cristallisé pour analyses (Prolabo).

Mode opératoire : on dispose du ballon de 50 ml contenant les méthylesters dans un excès d'alcool méthylique et d'acide sulfurique.

1ère extraction :

- on transvase dans la première ampoule à décanter tout en rinçant le ballon avec 50 ml d'eau
- on ajoute 30 ml de pentane, on bouche
- on agite, on chasse l'excès de pression, le tout jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de surpression dans l'ampoule. On fait reposer
- s'il y a une émulsion on ajoute du ClNa avec la spatule, on agite, on laisse reposer. (La majeure partie des acides gras est prise en solution dans le pentane).

2ème extraction :

- on verse la phase aqueuse de la première ampoule dans la deuxième ampoule et on remet la première ampoule qui contient la phase étherée (pentane) sur le socle
- on ajoute 30 ml de pentane dans l'ampoule n° 2 qui contient la phase aqueuse, on bouche
- on fait une 2ème extraction et après repos on jette la phase aqueuse. (Cette phase aqueuse contient de l'eau, de l'acide sulfurique, du méthanol, éventuellement du ClNa).

Rinçages :

- on transvase la phase étherée de l'ampoule n° 2 dans l'ampoule n° 1
 - on rince l'ampoule n°2 avec la pissette à pentane en recueillant le liquide de rinçage dans l'ampoule n° 1, on bouche
 - on ajoute 50 ml d'eau distillée ou déminéralisée (cette eau est destinée à laver la phase pentane des restants d'acides sulfurique qui la polluent)
 - on agite, on chasse l'excès de pression, on laisse reposer, on jette la phase aqueuse: c'est le premier rinçage
 - on fait un 2ème rinçage avec 50 ml d'eau et encore un 3ème rinçage avec 50 ml d'eau
 - sur l'eau de ce rinçage, on vérifie s'il reste des ions acides avec le papier pH
 - s'il y a des traces d'acidité, on fait un 4ème rinçage, etc... jusqu'à ce que le pH soit neutre (trois rinçages suffisent en général).
- (Il reste dans l'ampoule à décanter le pentane contenant les méthylesters en dissolution et un résidu aqueux).

Séchage :

- on verse le contenu de l'ampoule à décanter dans un ballon de 250 ml. On rince au pentane l'ampoule, le liquide de rinçage était versé dans le ballon
- on ajoute avec la spatule environ 2 g de SO_4Na_2 sec qui va absorber l'eau du milieu
- on met le bouchon sur le ballon
- on agite en tournant
- on laisse reposer une heure au moins (compte-minutes)(on peut éventuellement placer le ballon dans le réfrigérant et continuer la suite des manipulations le lendemain).

Evaporation du solvant :

- on évapore ensuite le pentane avec l'évaporateur rotatif jusqu'à ce qu'il reste un peu de pentane au fond du ballon de 250 ml, avec le sulfate de soude
- au-dessus d'un ballon de vidange, on dispose un petit entonnoir avec de la laine de verre pour faire un filtre destiné à arrêter les particules de sulfate de soude
- on rince la laine de verre avec du pentane au-dessus d'une vidange
- on place le filtre rincé au-dessus d'un ballon de 50 ml
- on filtre le contenu du ballon de 250 ml en laissant la majeure partie du sulfate de soude au fond
- on rince à plusieurs reprises le sulfate de soude avec du pentane en filtrant le liquide sur la laine de verre
- si cette filtration est insuffisante, on filtre ensuite sur le filtre amiante sable à pentane
- on a dans le ballon de 50 ml une solution de méthylesters dans le pentane sec. On bouche.

Si on dispose d'un chromatographe en phase gazeuse, cette solution, après concentration par évaporation du solvant (entraînement par un courant d'azote) est utilisée pour l'analyse des méthylesters. Si on ne dispose pas d'un tel chromatographe, il faut conserver les méthylesters en ampoules scellées. (Voir conservation des méthylesters)

2.6. CONSERVATION DES METHYLESTERS EN AMPOULES SCHELLES.

Principe. Les méthylesters sont mis en solution dans un solvant non inflammable. Cette solution est mise dans une ampoule scellée sous atmosphère d'azote, est entreposée au froid à - 20°C.

Matériel : - un évaporateur rotatif complet - une pipette graduée de 5 ml - une ampoule à sceller de capacité 5 ml, col large (Verrefer) - un tout petit entonnoir à long tube adapté à l'ampoule (Verrefer) - une pompe à vide (à utiliser du côté soufflerie d'air) (Prolabo) - une bouteille de gaz butane avec détendeur - un manodétendeur pour bouteille d'azote - un tube de verre effilé - un chalumeau à gaz butane et à air - un congélateur à -20°C.

Produits chimiques :

- tetrachlorure de carbone R.P. pour analyses (Prolabo)
- une bouteille d'azote sous pression.

Mode opératoire :

- on dispose du ballon de 50 ml contenant les méthylesters en solution dans du pentane
- on évapore le pentane à l'évaporateur rotatif. Il reste au fond du ballon les méthylesters sous l'apparence d'une huile, il reste probablement un résidu de pentane qu'il faut éliminer
- on ajoute 2 ml de tetrachlorure de carbone. On agite le ballon en le tournant pour y dissoudre les méthylesters et le résidu de pentane
- on évapore à l'évaporateur rotatif, dans le but de bien débarrasser le ballon du résidu de pentane dilué dans le tetrachlorure de carbone (on cherche en effet à éliminer le pentane qui est inflammable)
- on ajoute ensuite encore une fois 2 ml de tetrachlorure de carbone dans le ballon qu'on bouche
- on prépare immédiatement le matériel pour faire le scellement d'ampoule : on règle la flamme
- on transvase à l'aide de l'entonnoir à long col le contenu du ballon dans l'ampoule
- en laissant en place l'entonnoir, on fait arriver un courant d'azote; l'air s'échappe autour de la tige de l'entonnoir, il est remplacé dans l'ampoule par de l'azote
- puis on scelle immédiatement l'ampoule
- on la range dans le congélateur, à l'intérieur d'un récipient sec, hermétiquement fermé.

Au moment de la chromatographie en phase gazeuse, on retire l'ampoule du congélateur, on laisse équilibrer la température, on ouvre l'ampoule, on évapore l'excès de solvant avec un courant d'azote.

2.7. SEPARATION DES LIPIDES EN CLASSES. (Chromatographie sur colonne).

Principe. Une colonne d'acide silicique en poudre constitue la phase solide. L'échantillon de lipides est placé au sommet de la colonne. Des élu~~ions~~ successives par des solvants appropriés séparent les classes de lipides.

On recueille successivement trois fractions :

- les esters du cholestérol
- les glycérides et les acides gras
- les phospholipides.

(Les glycérides et les acides gras peuvent être séparés des uns des autres dans une opération ultérieure, voir 2.8.).

Matériel : - un évaporateur rotatif complet - une colonne à chromatographe (voir figure) - une trompe à vide ou une pompe à vide avec manomètre - un robinet à pointe pour régler du vide - un ballon de 250 ml pour la vidange - un ballon de 100 ml - deux ballons de 50 ml - un erlen de 100 ml - un petit entonnoir - une balance - une pipette graduée de 10 ml - trois éprouvettes de 10 ml - deux éprouvettes de 50 ml - une éprouvette de 100 ml - une pipette graduée de 1 ml (au 1/10) - cinq pissettes en verre (pour les divers solvants) - un becher de 50 ml - une spatule - un dessiccateur - une étuve à circulation d'air - une boîte de pétri sans couvercle diamètre : 15 cm - du coton hydrophile - une tige longue de 50 cm (diamètre 2 mm) en métal rigide - un petit support à plateau à hauteur réglable - un réfrigérateur - un récipient de vidange de 15 cm de diamètre environ.

Produits chimiques :

- acétone R.P. - éther éthylique R.P. - pentane redistillé au laboratoire - alcool méthylique R.P. (méthanol) - acide silicique 100 mesh sec (Mallinckrodt) - eau distillée ou déminéralisée - alcool absolu.

Mode opératoire :

a) préparation de la chromatographie.

1) préparation de la colonne;

- la veille ou l'avant veille de la séparation, peser 10 g environ d'acide silicique sur la grande boîte de pétri
- faire sécher 24 heures au moins à 100°C dans l'étuve à circulation d'air
- placer ensuite dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement complet, avant de faire la pesée du produit sec
- le jour de la séparation sur colonne, peser 5,5g d'acide silicique sec dans le becher de 50 ml
- replacer dans le dessiccateur jusqu'au moment de l'utilisation
- mettre au fond de la colonne un petit tampon de coton hydrophile, le tasser légèrement à l'aide de la tige métallique (ceci pour que l'acide silicique ne s'échappe

- pas par le bas de la colonne au cours des éluions
- verser par dessus les 5,5g d'acide silicique sec
- tasser la poudre en tapottant la colonne.

2) préparation des éluants dans les récipients :

dans les éprouvettes appropriées verser respectueusement :

- 10 ml d'acétone (éprouvette de 10 ml)
- 10 ml d'éthers (éprouvette de 10 ml)
- 10 ml de pentane (éprouvette de 10 ml)

- 30 ml d'éthers à 3 % dans le pentane (dans l'éprouvette de 50 ml) soit :
 - .. 0,9 ml d'éther (pipette de 1 ml au 1/10)
 - .. pentane jusqu'à 30 ml

- 50 ml d'éther pur (éprouvette de 50 ml)
- 80 ml de méthanol pur (éprouvette de 100 ml).

On les place en ligne dans l'ordre indiqué près de la colonne à chromatographier.

3) Indications pour l'écoulement des éluants et le changement d'éluant :

Les éluants doivent couler goutte à goutte à raison d'une goutte par seconde environ. Lorsqu'on verse le premier liquide sur la colonne, on règle le vide à -100 mm de mercure jusqu'à ce que la colonne soit complètement imprégnée. Quand le liquide commence à couler, on règle le débit en manoeuvrant le robinet à pointeau de telle sorte qu'il s'échappe une goutte par seconde. On ajoute un éluant de nature différente lorsque le niveau du précédent s'abaisse jusqu'à affleurer à la surface de l'acide silicique. On règle à nouveau le débit à chaque changement d'éluant.

4) Indications pour le changement de récipient :

Lorsqu'on veut recueillir les diverses fractions lipidiques, il faut changer le récipient inférieur alors que se continue la chromatographie. Pour cette opération, on actionne le robinet A de telle sorte que le ballon soit en communication avec l'atmosphère et non pas avec la colonne. On tourne immédiatement le robinet B pour faire passer le vide seulement dans le réceptacle intermédiaire et pas dans le ballon. Il faut alors que le ballon soit retenu par un support (petit support à hauteur réglable). On change alors de ballon (ou erlen) tandis que l'éluant s'accumule au fond du réceptacle intermédiaire. (En cas d'erreur de manoeuvre, on a toujours la ressource d'arrêter l'écoulement du liquide pour un temps très court grâce au robinet C). Quand le nouveau récipient est en place, on remet les robinets A et B dans leur position initiale (et éventuellement le robinet C).

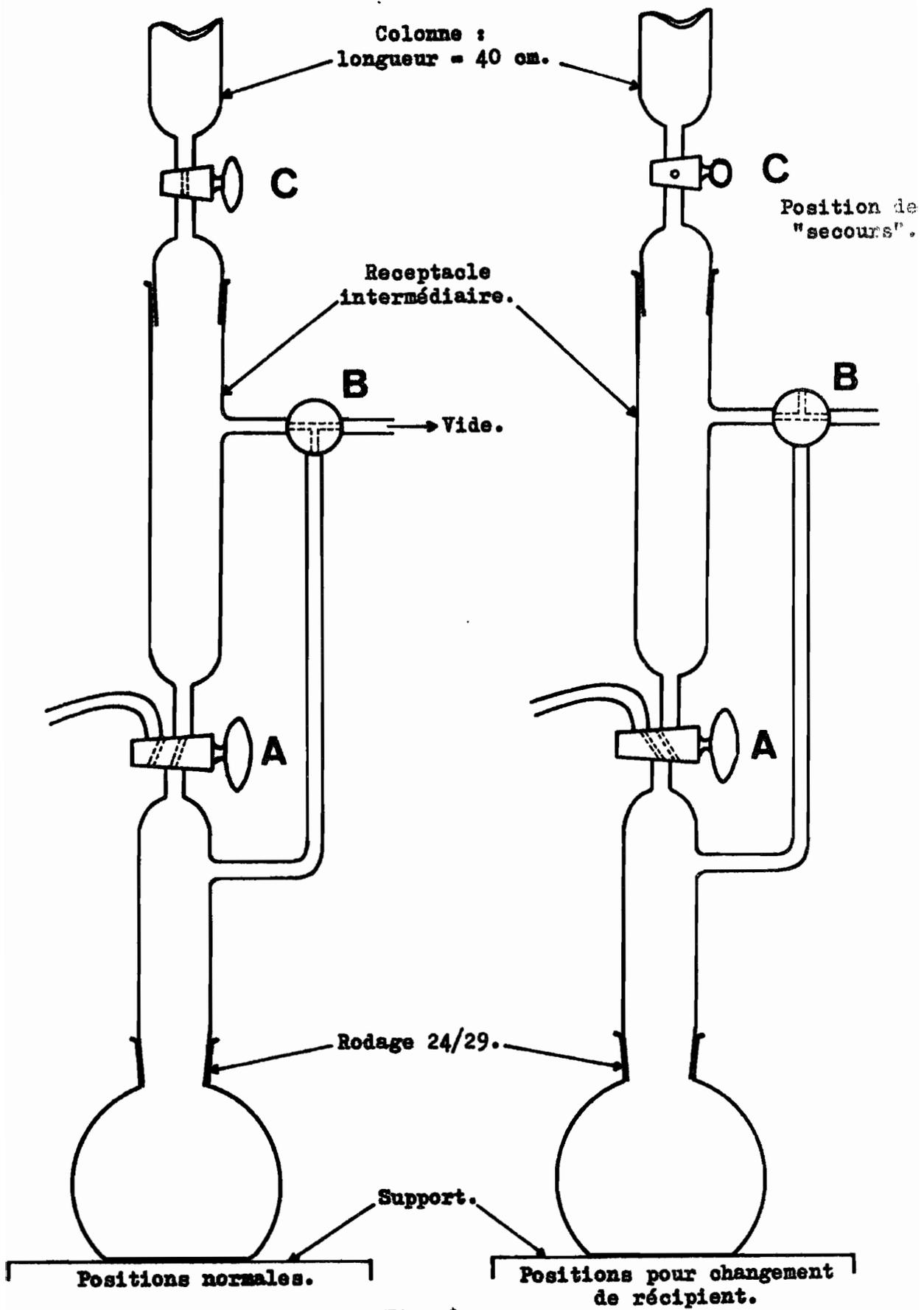


Fig. 9

Le changement de récipient doit se faire rapidement, sans hésitation.

5) Préparation de l'échantillon;

On dispose de la solution de lipides totaux dans le chloroforme, dans une fiole de 50 ml, conservée au froid et de concentration comme approximativement (voir 2.1., calculs et exemples).

- on retire la fiole du réfrigérateur et on la laisse bouchée jusqu'à ce que sa température soit équilibrée avec celle du laboratoire
- connaissant la concentration des lipides, on calcule la quantité de solution contenant au maximum environ 150 mg de lipides totaux (voir 2.7., exemple de calcul)
- on prélève cette quantité avec une pipette graduée de 10 ml et on la verse dans un ballon de 50 ml
- on évapore soigneusement le chloroforme
- on dilue les lipides restant dans 10 ml de pentane redistillé. C'est la "charge".

b) Chromatographie proprement dite.

1) nettoyage de la colonne :

- placer le ballon de vidange (250 ml) sous la colonne
- verser successivement sur la colonne
 - 10 ml d'acétone
 - 10 ml d'éther
 - 10 ml de pentane

Après cette opération la colonne est propre de toute impureté lipidique.

2) mise en place de la charge :

- lorsque le pentane affleure au niveau de l'acide silicique, on verse la charge tout en laissant en place le ballon de vidange
- les lipides s'accroissent au sommet de la colonne tandis que les hydrocarbures sont entraînés.

3) séparation des lipides en classes :

- quand la surface du liquide de la charge affleure au niveau de la surface de l'acide silicique en tenant compte de la remarque soulignée en (2.7., a, 3),

On verse successivement	!	on recueille
- 30 ml d'éther à 3% dans le pentane	!	Les esters du cholestérol (cholestérides) dans un ballon de 50 ml
- 50 ml d'éther pur	!	Les acides gras libres et les glycérides dans un erlen de 100 ml
- 80 ml de méthanol pur	!	Les phospholipides dans un ballon de 100 ml

On bouche immédiatement chaque flacon. Au cas où on n'est pas prêt à exécuter l'étape suivante du travail, les flacons bouchés peuvent être placés dans le réfrigérateur.

c) Nettoyage de la colonne :

- on démonte la colonne en la soulevant au-dessus du récipient intermédiaire
- on démonte le robinet C
- on renverse la colonne et on se débarrasse de son contenu en s'aidant de la tige métallique
- on rince la colonne abondamment à l'eau ordinaire et ensuite, avec les pissette, à l'eau distillée ou déminéralisée, à l'alcool absolu et à l'éther
- on nettoie également la partie intermédiaire à l'alcool et à l'éther en plaçant au-dessous un récipient de vidange de 15 cm de diamètre environ
- on remet la colonne en place
- lorsqu'elle est sèche, elle est prête pour un emploi ultérieur.

Exemple de calcul du volume de solution lipidique servant à préparer la charge :

- on dispose d'une fiole jaugée contenant 50 ml de lipides totaux, à une concentration d'ordre de grandeur de 7,25 mg par ml au plus (voir 2.1., exemple)
- 150 mg de lipides seraient contenus dans :

$$150 : 7,25 = 20,7 \text{ ml.}$$

La manipulation sera faite sur une prise de 20 ou 21 ml.

2.8. SEPARATION DES GLYCERIDES ET DES ACIDES GRAS LIBRES.
(séparation par saponification à froid et décantation).

Principe. On met le mélange d'acides gras libres et de glycérides en présence de potasse à faible concentration et à froid. Les acides gras libres se combinent à la potasse pour former des savons :



tandis que les glycérides restent inchangés dans ces conditions.

Les glycérides sont solubles dans l'éther de pétrole et insolubles dans l'eau, tandis que c'est l'inverse pour les savons. Ces propriétés permettent leur séparation par décantation.

Matériel : un erlen de 100 ml - un évaporateur rotatif complet - une

éprouvette de 50 ml - une éprouvette de 10 ml - une ampoule à décanter de 250 ml avec un support, un petit entonnoir et un bouchon - un ballon de 250 ml - un ballon de 50 ml - une pissette en verre (pour l'éther de pétrole) - une spatule - papier pH - un ballon de 100 ml.

Produits chimiques :

- eau distillée ou déminéralisée - éther de pétrole redistillé.
- KOH N/100 dans le mélange méthanol-eau (v-v) - ClNa R.P. pour analyses, en cristaux.

Mode opératoire :

à l'issue de la chromatographie sur colonne, le mélange des acides gras libres et des glycérides est en solution dans l'éther éthylique dans un erlen de 100 ml.

Evaporation du solvant initial :

- on évapore l'éther éthylique à l'évaporateur rotatif, les lipides restent au fond du ballon.

1ère saponification:(saponification de la majeure partie des acides gras libres)

- on transvase dans une ampoule à décanter de 250 ml en rinçant avec 30 ml d'éther de pétrole
- on ajoute avec l'éprouvette de 10 ml du KOH N/100
- on agite, on laisse échapper l'excès de pression, ceci plusieurs fois jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'excès de pression; on laisse décanter. Au besoin, s'il se forme une émulsion, on ajoute ClNa pur.

La phase aqueuse, inférieure, contient la majeure partie des acides gras libres initiaux sous forme de savons. La phase étherée, supérieure, contient les glycérides et un résidu des acides gras libres initiaux, non encore saponifiés. (Ils seront saponifiés au cours de la deuxième saponification).

- on verse la phase aqueuse dans un ballon de 250 ml en laissant la phase étherée dans l'ampoule.

2ème saponification:(saponification du résidu des acides gras libres)

- on ajoute dans l'ampoule 10 ml de KOH N/100
- on agite comme pour la première saponification, on laisse décanter
- on verse la phase aqueuse dans le même ballon de 250 ml.

Premier rinçage :

- ajouter dans l'ampoule à décanter 30 ml d'eau distillée ou déminéralisée qui prendra en solution les quelques savons et la potasse susceptibles d'être restés dans l'ampoule
- agiter, laisser reposer
- vider la phase aqueuse dans le ballon de 250 ml

Deuxième et troisième rinçages :

- recommencer deux fois, avec 30 ml d'eau distillée ou déminéralisée
- vérifier avec du papier pH que la dernière eau de rinçage est neutre, sinon recommencer (en général, trois rinçages suffisent)
- quand la dernière phase aqueuse est versée dans le ballon de 250 ml, il reste dans l'ampoule les glycérides dissous dans l'éther de pétrole, toute trace de potasse ayant été éliminée
- on verse cette phase étherée dans un ballon de 100 ml, en rinçant l'ampoule avec de l'éther de pétrole à l'aide d'une pissette

A la fin de cette opération, acides gras libres initiaux et glycérides sont séparés :

- les acides gras libres initiaux sont, sous forme de savon de potasse en solution aqueuse, dans un ballon de 250 ml
- les glycérides sont en solution dans l'éther de pétrole dans un ballon de 100 ml.

SOLUTION DE KOH ENVIRON N/10 DANS LE MELANGE METHANOL-EAU(v-v).

Matériel : - une boîte de pétri (diamètre 9 cm) - une balance - deux éprouvettes de 500 ml - deux flacons de 1 litre - un entonnoir (diamètre 9 cm) - une spatule - une fiole jaugée de 1 litre.

Produits chimiques :

- eau distillée ou déminéralisée - alcool méthylique R.P. pour analyses (méthanol) - KOH en pastilles R.P. pour analyses.

Mode opératoire :

- verser respectivement dans les deux éprouvettes de 500 ml de l'eau et dans l'autre 500 ml de méthanol
- verser le contenu des deux éprouvettes dans un flacon de 1 litre, agiter. C'est le mélange méthanol-eau (v-v)
- tarer la boîte de pétri
- y verser le plus rapidement possible (pour éviter l'hydratation) 5,6g de KOH en pastilles, en s'aidant de la spatule
- verser avec la spatule les pastilles de KOH au fond de la fiole de 1 litre
- rincer la boîte de pétri avec du mélange méthanol-eau et ajouter les liquides de rinçage dans la fiole jaugée surmontée de l'entonnoir
- ajouter un peu de mélange méthanol-eau

- agiter, le liquide s'échauffe
- laisser refroidir et ajuster au trait de jauge avec le mélange méthanol-eau
- verser dans un flacon de 1 litre.

Utilisation : sert à préparer la solution de KOH environ N/100 dans le mélange méthanol-eau (v-v).

SOLUTION DE KOH ENVIRON N/100 DANS LE MELANGE METHANOL-EAU (v-v).

Matériel : - une éprouvette de 100 ml - deux éprouvettes de 500 ml - une éprouvette de 1 litre - un agitateur - deux flacons de 1 litre.

Produits chimiques :

- KOH environ N/10 dans le mélange méthanol-eau (v-v)
- alcool méthylique R.P. pour analyses (méthanol) -eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire :

- verser respectivement dans les deux éprouvettes de 500 ml : 500 ml de l'eau et 500 ml de méthanol
- verser le contenu de ces deux éprouvettes dans un flacon de 1 litre. C'est le mélange méthanol-eau (v-v)
- mesurer 100 ml de KOH N/10 avec la petite éprouvette
- transvaser dans l'éprouvette de 1 litre
- ajouter du mélange méthanol-eau (v-v) en agitant jusqu'au niveau de 1 litre
- transvaser dans un flacon de 1 litre.

Utilisation : sert à saponifier à froid les acides gras libres qui se trouvent mélangés à des glycérides, sans que ces derniers soient saponifiés.

2.9. MANIPULATION A FAIRE SUBIR AUX QUATRE FRACTIONS LIPIDIQUES (issues de la chromatographie sur colonne (2.7.) et de la séparation entre glycérides et acides gras(2.8)),

Ces manipulations font intervenir les principes antérieurement exposés, sans que soit utilisé aucun matériel ou produit chimique nouveau. Nous nous bornerons donc à indiquer les lignes directrices. Pour le détail, il faudra se reporter aux manipulations antérieurement décrites.

a) Manipulations sur les esters du cholestérol (cholestérides) et les phospholipides.

Ces catégories de lipides se présentent de la façon suivante :

- les esters du cholestérol sont en solution dans 30 ml de pentane contenant 3 % d'éther éthylique. Ils proviennent directement du partage par chromatographie sur colonne. Ils sont dans un ballon de 50 ml
- les phospholipides sont en solution dans 80 ml de méthanol pur. Ils proviennent de la chromatographie sur colonne. Ils sont dans un ballon de 100.

On fait subir parallèlement à ces deux extraits la même suite de manipulations :

- évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif
- puis saponification à chaud, acidification et extraction des acides gras, méthylation, extraction des méthylesters conservation des méthylesters en ampoules scellées

(du point de vue pratique, une fois l'évaporation du solvant faite, on reprend la série des manipulations à partir de 2.2. x, jusqu'à la fin de 2.6.).
(p. 65)

On aboutit respectivement aux méthylesters des cholestérides et des phospholipides, en ampoules scellées.

b) Manipulations sur les glycérides.

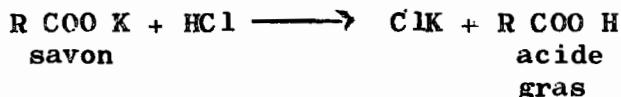
Ils sont en solution dans l'éther de pétrole, avec une légère quantité d'eau (puisqu'ils proviennent d'une séparation par décantation utilisant de l'eau) dans un ballon de 100 ml.

- on évapore le solvant à l'évaporateur rotatif
- on sèche le résidu aqueux en l'entraînant avec de l'alcool absolu à l'évaporateur rotatif
- puis on fait une saponification à chaud (voir 2.2, p. 65, à partir de x) puis toute la suite des manipulations aboutissant aux méthylesters des glycérides en ampoules scellées.

c) Manipulations sur les savons des acides gras libres.

Ils sont en solution aqueuse, en présence d'un léger excès de potasse, dans un ballon de 250 ml. Ils proviennent de la séparation par décantation

- on acidifie le milieu avec 0,2 ml de HCl 4N (avec une pipette de 1 ml graduée au 1/10)
- on vérifie avec du papier pH que la solution est bien devenue acide, sinon on ajoute de l'acide goutte à goutte Les acides gras sont libérés des savons



- on transvase dans une ampoule à décanter en rinçant avec 30 ml d'éther et on reprend l'extraction des acides gras à (2.3. xx, p. 67)
- on continue la suite des manipulations aboutissant aux méthylesters des acides gras libres en ampoules scellées.

MELANGE SULFOCHROMIQUE.

Matériel : .. un grand erlen en verre borosilicaté - un becher de 100 ml - une balance - une spatule - une éprouvette de 50 ml - une éprouvette de 1 litre - une grande cuvette pour bain-marie froid - un flacon en verre avec bouchon résistant aux acides.

Produits chimiques :

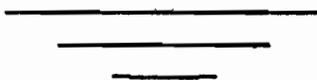
- bichromate de potassium ordinaire
- eau ordinaire
- acide sulfurique technique.

Mode opératoire :

- peser dans le becher 35 g de bichromate de potassium
- verser dans le grand erlen
- ajouter 50 ml d'eau chaude et agiter jusqu'à complète dissolution
- placer l'erlen dans le bain-marie froid. Y verser le bichromate dilué en tournant l'erlen
- ajouter peu à peu un litre de SO_4H_2 en agitant l'erlen
- le mélange chauffe et passe par une phase où la dissolution semble difficile
- persister dans l'opération jusqu'à ce que tout l'acide sulfurique soit versé
- on a alors un dépôt solide au fond de l'erlen
- on laisse au repos l'erlen et son contenu, peu à peu le dépôt se dilue de façon homogène. Le mélange est alors prêt à l'emploi. On le range dans une bouteille à bouchon résistant aux acides.

Ce produit est dangereux, il ne faut pas le mettre en contact avec la peau.

Utilisation : ce mélange doit-être employé sur de la verrerie déjà lavée d'une manière ordinaire (au teepol) et rincée. Cette verrerie d'apparence propre peut contenir encore quelques impuretés pouvant nuire aux dosages, le contact assez prolongé avec le mélange sulfochromique les élimine par oxydation. Il faut ensuite rincer abondamment à l'eau ordinaire, puis à l'eau purifiée (deminéralisée ou distillée).



BIBLIOGRAPHIE. .

- Anon. - 1961 - Méthodes d'analyses des aliments pour les animaux. Institut professionnel de Contrôle et de Recherches scientifiques des Industries de l'Alimentation animale. Paris, 35 p.
- Anon. - 1966 - Méthodes recommandées pour l'échantillonnage, l'identification et l'analyse des aliments. Instituts nationaux de la Santé - Bethesda, Maryland, 102 p.
- FOUILLOUZE (G.) - 1951 - Chimie qualitative et quantitative appliquée. Camugli, Lyon, 2 volumes 719 p. et 528 p.
- LEMARCHAL (P.) - 1967 - Recherches sur la désaturation de l'isomère trans de l'acide oléique par le foie de rat ; intérêt biochimique et physiologique. Thèse Sciences, Paris, 82 p., multigr.

D O C U M E N T S D E J A P A R U S

- N° 1 - PITON (B.), PRIVE (M.), TERAY (A.) - Août 1968.
Résultats des observations physico-chimiques des croisières 6814 et 6823 du "VAUBAN". 4 p., 2 fig. ht., 19 p. ht.
- N° 2 - CHABANNE (J.), PLANTE (R.), LABOUTE (P.) - Octobre 1968.
Résultats des chalutages (crevettes et poissons) en Baie d'Ambaro (côte N.W.). Mars 1965 - Février 1967. 57 p., 2 fig. ht.
- N° 3 - FRONTIER-ABOU (D.) - Octobre 1968.
Etude du muscle de trois espèces de Carangidés : composition globale et résultats statistiques. 10 p.
- N° 4 - CHABANNE (J.), LABOUTE (P.) - Novembre 1968.
Résultats de la pêche à la traîne sur le plateau continentale de la côte nord-ouest (Avril 1965 à Octobre 1968). 17 p., 2 fig. ht.
- N° 5 - PITON (B.), PRIVE (M.), TERAY (A.) - Juin 1969.
Résultats des observations physico-chimiques en Baie d'Ambaro de Janvier 1968 à Juin 1969. 6 p., 71 p. ht.
- N° 6 - PITON (B.), PRIVE (M.), TERAY (A.) - Août 1969.
Résultats des observations physico-chimiques en Baie d'Ampasindava, sur le plateau continental et au large de la côte nord-ouest de Madagascar de Décembre 1967 à Janvier 1969. 6 p., 50 p. ht.
- N° 7 - FRONTIER (S.) - Septembre 1969.
Méthodes d'analyse statistique applicables à l'écologie du plancton. 33 p., 7 fig. ht.
- N° 8 - FRONTIER-ABOU (D.), VOLAMORA (M.A.) - Octobre 1969.
Données numériques sur 31 espèces de poissons comestibles de la région de Nosy-Bé : mensurations, composition globale du muscle blanc, valeurs caloriques, corrélations. 74 p.
- N° 9 - PETIT (D.), BHAUD (M.), BINET (D.), BOUR (W.), DESSIER (A.), FRONTIER (S.), LABOUTE (P.) - Novembre 1969.
Le filet "Lucifer". Description - Manoeuvre - Performances. 10 p., 7 fig. ht.
- N°10 - PLANTE-CUNY (M.R.) - Janvier 1970.
Données méthodologiques pour aborder la production primaire dans les sédiments marins. 36 p.
- N°11 - FRONTIER-ABOU (D.), VOLAMORA (M.A.) - Février 1970.
Données numériques sur 110 individus de l'espèce Caranx ignobilis : mensurations, composition globale des muscles blanc et rouge, du foie et des gonades. 25 p.
- N°12 - CHABANNE (J.) - Février 1970.
La pêche à la traîne sur la partie nord-ouest du plateau continental de Madagascar. 19 p., 3 fig. ht.

- N°13 - FRONTIER-ABOU (D.) - Décembre 1972.
Techniques d'étude d'organismes marins et de farines de poissons : composition globale et lipides. 82 p., 9 fig.
- N°14 - CHABANNE (J.), PLANTE (R.) - Juin 1970.
La pêche au chalut des crevettes Penaeides sur la côte ouest de Madagascar - Méthodes utilisées dans l'étude de la pêcherie. 15 p., annexes 10 p.
- N°15 - FRONTIER-ABOU (D.) - Juin 1970.
Dosage de l'azote sur 60 échantillons de sédiments superficiels de la baie d'Ambaro. 16 p.
- N°16 - DANIEL (J.), DUPONT (J.), JOUANNIC (C.) - Juin 1970.
Etude de la relation entre le carbone organique et l'azote dans les sédiments de la baie d'Ambaro. 11 p., 9 fig. ht.
- N°17 - MAGNIER (Y.), PITON (B.), TERAY (A.), AH-KAM (D.) - Juillet 1970.
Résultats des observations physico-chimiques en baies d'Ambaro et d'Am-pasindava de Juin 1969 à Février 1970. 66 p., 3 fig. ht.
- N°18 - ANONYME - Août 1970.
Organisation de la Bibliographie de Nosy-Bé. 15 p., 2 p. ht.
- N°19 - PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Octobre 1970.
Distributions horizontales et verticales de quelques propriétés physiques et chimiques en baie d'Ambaro. 3 p., 26 p. ht.
- N°20 - PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Février 1971.
Sur la détermination de la chlorophylle "a" dans l'eau de mer côtière tropicale. 14 p., 9 fig. ht.
- N°21 - MAGNIER (Y.), PITON (B.) - Avril 1971.
Observations physico-chimiques faites par le "VAUBAN" le long de la côte nord-ouest de Madagascar de Janvier à Septembre 1970. 8 p., 118 p. ht.
- N°22 - CHABANNE (J.), PRADO (J.) - Juillet 1971.
Etude des concentrations de poissons obtenues par la lumière dans la région de Nosy-Bé - Madagascar. 19 p.
- N°23 - CHABANNE (J.), PLANTE (R.) - Octobre 1971.
Etude des rendements de la pêche au chalut des crevettes Penaeides sur la côte N.W. de Madagascar de 1966 à 1970. 19 p., 10 fig. ht., 4 annexes ht., 6 tabl. ht.
- N°24 - BOUR (W.), FRONTIER (S.), PETIT (D.) - Novembre 1971.
Zooplankton d'une baie eutrophique tropicale.
- 1. Indications préliminaires par FRONTIER (S.).
- 2. Méthodologie des prélèvements par PETIT (D.) et BOUR (W.).
- 3. Situation écologique de la baie d'Ambaro : Etude d'une radiale côte-océan par FRONTIER (S.), BOUR (W.), PETIT (D.).
- 4. Cycle annuel des poids secs par PETIT (D.) et FRONTIER (S.).
- 5. Etude statistique de la dispersion du plancton par FRONTIER (S.).
95 p., 67 p. ht.

- N°25 - MARCILLE (J.) - Février 1972.
Les stocks de crevettes Pénéides côtières malgaches. 14 p., 10 fig.
- N°26 - MAGNIER (Y.), PITON (B.), CITEAU (J.) - Avril 1972.
Observations physico-chimiques faites par le "VAUBAN" dans l'Océan Indien de Novembre 1970 à Mars 1971. 1 fig. ht., 127 p. ht.
- N°27 - CHABANNE (J.) - Mai 1972.
Etude sur la biologie des Caranx ignobilis, Caranx sexfasciatus et Caranx melampyngus de la région de Nosy-Bé. 42 p., 8 fig., 2 p. ht.
- N°28 - FRONTIER (S.) - Juin 1972 (Suite du Doc. n° 24).
Zooplancton d'une baie eutrophique tropicale :
- 6. Répartition spatiale et annuelle de quelques taxons.
Première partie :
Cladocères, Euphausiacés, Mollusques.
14 p., 50 fig.
- N°29 - CITEAU (J.) - Juillet 1972.
Analyse du molybdène dissous dans l'eau de mer. 14 p., 4 fig.
- N°30 - MAGNIER (Y.), PITON (B.), CITEAU (J.) - Janvier 1973.
Bathythermogrammes recueillis par le "VAUBAN" de 1968 à 1972 dans l'ouest de l'Océan Indien sud-équatorial. En avant-propos : aperçu thermique de la région et remarques sur la thermocline. 16 p., 14 fig., 61 p. ht.
- N°31 - CITEAU (J.), PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Mars 1973.
Sur la circulation géostrophique dans l'ouest de l'Océan Indien sud-équatorial. 29 p., 17 fig.
- N°32 - LE RESTE (L.) - Mars 1973.
Zones de ponte et nurseries de la crevette "Penaeus indicus" H. Milne Edwards le long de la côte nord-ouest de Madagascar. 11 p., 16 fig. ht.
- N°33 - ANONYME - Mars 1973.
Publications du Centre O.R.S.T.O.M. de Nosy-Bé. Liste mise à jour au 31-12-71. 104 p.
- N°34 - CITEAU (J.), PITON (B.), MAGNIER (Y.) - Avril 1973.
Observations physico-chimiques faites par le "VAUBAN" dans l'Océan Indien au large du Cap d'Ambre et de Juan de Nova, de Mai 1971 à Mars 1972. 154 p., 2 fig. ht.
- N°35 - MARCILLE (J.), VEILLON (P.) - Avril 1973.
La pêche crevettière à Madagascar - Evolution des stocks. 28 p., 15 fig.
- N°36 - MARCILLE (J.), VEILLON (P.) - (Sous presse).
Prospections et pêches thonnières au nord et à l'ouest de Madagascar en 1972.