

Filière Sciences de la vie

(Semestre 3. Année universitaire 2021-2022)

Module : BIOCHIMIE STRUCTURALE

# Travaux Pratiques



DEROULEMENT ET ORGANISATION DES TP DE BIOCHIMIE  
SV-S3 : 2021 / 2022

# SOMMAIRE

	Page
<b>Généralités</b>	
- <a href="#">Rappel des définitions en Chimie et Biochimie (normalité, molarité, .. ...</a>	3
- <a href="#">Verrerie utilisée aux travaux pratique de Biochimie</a> .....	7
- <a href="#">Volumétrie (pipettes, ..)</a> .....	7
- <a href="#">Appareillage et mesures (spectrophotométrie, pHmétrie, ..)</a> .....	8
 <a href="#">Conseils aux étudiants</a> .....	 13
<a href="#">Compte-rendu</a> .....	14
 <a href="#">Modalités du contrôle continu en travaux pratiques</a> .....	 15
 <a href="#">TP 1. Etude des lipides</a> .....	 16
 <a href="#">TP2. Etude des Glucide et des acides aminés</a> .....	 23

# GENERALITES

## I. RAPPEL DE QUELQUES DEFINITIONS EN CHIMIE ET BIOCHIMIE

La plupart de des définitions ont été données au cours de l'enseignement de CHIMIE S1.

**1 mole** = N entités élémentaires identiques

N =  $6,02 \cdot 10^{23}$  nombre d'AVOGADRO

Exemple d'entités : atomes, molécules, ions, électrons, ...

Poids moléculaire du glucose = 180,156 signifie : 1 mole de glucose pèse 180,156 g.

Poids moléculaire de l'albumine = 68 000 signifie : 1 mole d'albumine pèse 68 000 g ou 68 Kg.

### A. MOLE D'EQUIVALENT (ou équivalent)

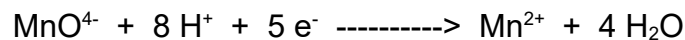
Une mole d'équivalent est la quantité d'acide pouvant libérer une mole d'ion  $H_3O^+$  au cours d'une réaction de neutralisation.

- *Exemple 1* : 1 mole d'acide chlorhydrique (HCl) libère 1 équivalent.  
1 mole d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) libère 2 équivalents.
- C'est la quantité de base susceptible de neutraliser une mole d'équivalent acide.
  - *Exemple 2* : 1 mole de soude (NaOH) neutralise 1 mole de HCl. C'est-à-dire un équivalent d'acide ; d'où 1 mole de NaOH correspond à un équivalent.
  - *Exemple 3* : 1/2 mole de chaux ( $Ca(OH)_2$ ) neutralise 1 mole de HCl. C'est-à-dire un équivalent d'acide ; d'où 1/2 mole de  $Ca(OH)_2$  correspond à un équivalent.
- C'est la quantité d'agent oxydant (ou réducteur) capable de capter (ou de céder) une mole d'électrons.
  - *Exemple 4* : soit une mole d'ions d'agent oxydant  $Fe^{3+}$  pouvant capter une mole d'électrons suivant la réaction :



Une mole d'ions  $Fe^{3+}$  correspond à une mole d'équivalent.

- *Exemple 5* : soit une mole d'ions  $MnO_4^-$  pouvant capter 5 moles d'électrons suivant la réaction :



D'où 1/5 de mole d'ions  $MnO_4^-$  correspondant à 1 mole d'équivalent.

### B. NORMALITE

- La normalité d'une solution acide (symbole : N) indique la quantité de moles d'ions  $H^+$  ou  $H_3O^+$ , libérables au cours d'une réaction de neutralisation, que cette solution contient dans un litre, donc le nombre d'équivalents.
  - *Exemple 6* : une solution 2N de HCl contient 2 équivalents par litre, ou 2 moles de HCl par litre.
  - *Exemple 7* : une solution 0,1N de  $H_2SO_4$  contient 0,1 équivalent par litre, ou 0,05 mole par litre de  $H_2SO_4$ .

- La normalité d'une solution de BASE indique le nombre d'équivalent d'acide qu'un litre de cette solution peut neutraliser.
  - Exemple 8 : 1 litre d'une solution de soude 0,5N neutralise 0,5 équivalent d'acide.
- La normalité d'une solution d'un agent oxydant (ou réducteur) indique le nombre de moles d'équivalents de cet agent que contient un litre de solution.

On dit qu'une solution est NORMALE quand elle contient une mole d'équivalent d'acide, de base ou d'agent oxydant (ou réducteur) par litre.

On peut déduire des définitions précédentes que :

- Deux solutions de même normalité réagissent volume à volume.
- Pour qu'une réaction soit quantitative, il faut mettre en présence autant d'équivalents d'un réactif que de l'autre.

### C. MOLARITE

La molarité d'une solution d'acide, de base, d'agent oxydant (ou réducteur) indique le nombre de moles d'acide, de base, d'agent oxydant (ou réducteur) qu'elle contient par litre.

Souvent dans les réactions biochimiques, il est nécessaire de connaître le nombre de mole d'une substance dans la solution, et celle-ci peut être facilement déduite à partir de la molarité de la solution et le volume présent.

- Une solution molaire (M) = 1 mol/l = 1 mmol/ml = 1  $\mu$ mol/ $\mu$ l
- Une solution millimolaire (mM) = 1 mmol/l = 1  $\mu$ mol/ml

Vérifier si vous avez compris cette idée en essayant de résoudre le calcul suivant :

1. Combien de grammes de glucose sont nécessaires pour préparer 100 ml d'une solution molaire ? (PM du Glucose = 180,156). Réponse : 18,0156 g/100 ml.
2. Combien de millimoles ou micromoles par millilitre existent dans les solutions suivantes : (a) urée 6 mol/l ; (b) NaCl 0,15 mol/l ; (c) fructose 12 mmol/l ; (d) ATP 0,2 mmol/l. Réponse : urée : 6 mmol/ml ; NaCl : 150 mmol/ml ; fructose : 12  $\mu$ mol/ml ; ATP : 0,2  $\mu$ mol/ml.
3. Combien de grammes de glycine sont présents dans 10 ml de solution 20 mmol/l ? (PM Glycine = 75). Réponse : 15 mg.

### D. RAPPORT ENTRE NORMALITE ET MOLARITE

Si n est le nombre de moles équivalent contenu dans une mole d'acide, de base ou d'agent oxydant (ou réducteur), on a la relation :

$$\text{NORMALITE} = \text{MOLARITE} \times n$$

- Exemple 9 : 1 mole de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contient 2 moles d'ions H<sup>+</sup> donc 2 moles d'équivalent ; donc n = 2 ; une solution molaire de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sera donc 2N.

### E. CONCENTRATION MASSIQUE

C'est la MASSE en grammes de soluté par litre de solution.

- Exemple 10 : NaCl à 10 g/litre.

### F. CONCENTRATION EN POURCENTAGE

C'est la masse en grammes de soluté pour 100 g de solution.

- Exemple 11 : Sulfate d'ammonium à 33% quand c'est % (P/P), si non le plus utilisé est le % (P/V). Mais il faut éviter d'utiliser le terme %, à moins qu'il soit clairement défini, car il peut conduire à des confusions.

- Exemple 12 : une solution d'acide acétique à 2 % peut signifier :

- 2 g d'acide acétique par 100 g d'eau (p/p),

- 2 g d'acide acétique par 100 ml d'eau (p/v),
- 2 ml d'acide acétique par 100 ml d'eau (v/v).

**REMARQUE :** Lors de la préparation d'une solution à x %, on tient compte de la densité du solvant, lorsque le soluté est liquide.

- *Exemple 13 :* solution commerciale d'acide sulfurique concentré. Une telle solution contient 95 % d'acide sulfurique, autrement dit 95 g d'acide pour 100 g de solution. La densité de la solution est de 1,84 (1 ml pèse 1,84 g), ce qui veut dire que pour avoir 100 g de solution (ou 95 g d'acide) on prélèvera 100 ml/1,84, soit 54,3 ml de solution commerciale.

## G. DILUTIONS

Diluer une solution consiste à diminuer sa concentration. Lorsqu'on veut passer, par exemple, d'une solution de NaCl à 10 g/l à une solution de NaCl à 1 g/l, on effectue une dilution ; dans ce cas, on dilue 10 fois avec un solvant la solution de départ. 10 est la valeur du facteur de dilution. On dit aussi qu'on a effectué une dilution au 1/10<sup>ème</sup>. 1/10<sup>ème</sup> est la valeur du taux de dilution.

Exemple, si on veut préparer seulement 2 ml de la solution de 1 g/l à partir de la solution initiale de 10 g/l. On utilise la relation :  $C_i V_i = C_f V_f$

avec 
$$V_i = \frac{C_f V_f}{C_i}$$

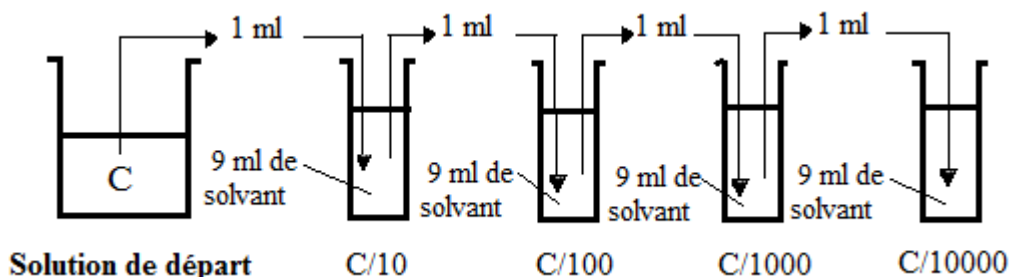
d'où 
$$V_i = \frac{2 \text{ ml}}{10} \text{ et } V_i = 0,2 \text{ ml}$$

Donc on prend 0,2 ml de la solution concentrée initiale et on lui ajoute 9,8 ml d'eau.

## H. DILUTIONS SUCCESSIVES

Cette méthode de dilutions successives est employée lorsqu'on veut diluer fortement une solution de façon précise et économique.

- *Exemple 14 :* dilution au 1/10 000<sup>ème</sup> (facteur de dilution 10 000). Exemple quand on veut passer des concentrations de l'ordre de moles/litre à picomoles/litre. (1 picomole = 10<sup>-12</sup> mole)



## I. OSMOLARITE

L'osmolarité est égale à la molarité des particules dans une solution. Une solution d'1 mol/l formé de solutés non dissociables est 1 Osmolar (la solution contient 6,023 10<sup>23</sup> particules/litre). Une solution de 1 mol/l de NaCl (soluté dissociable) est de 2 Osmolar (2 est le nombre d'ions produit par molécule). Une solution de KCl 0,03 mol/l est 0,06 Osmolar.

L'osmolarité est souvent utilisée en physiologie pour préparer les milieux physiologiques d'incubations des tissus et cellules.

### J. FORCE IONIQUE

$$\frac{\tau}{2} = \frac{1}{2} \sum M_i Z_i^2$$

M<sub>i</sub> = la molarité de l'ion,

Z<sub>i</sub> = la charge nette de l'ion (indépendamment du signe),

Σ = symbole signifiant « la somme de ».

La force ionique mesure la concentration des charges dans une solution. Quand la force ionique d'une solution augmente, le coefficient d'activité d'un ion diminue.

La relation entre la force ionique et la molarité dépend du nombre des ions produits et leur charge net.

Sel		Force ionique
Type	Exemples	
1 : 1	KCl ; NaBr	M
2 : 1	CaCl ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 X M
2 : 2	MgSO <sub>4</sub>	4 X M
3 : 1	FeCl <sub>3</sub> ; NaPO <sub>4</sub>	6 X M
2 : 3	Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	15 X M

Type indique la charge nette des ions. Donc MgSO<sub>4</sub>, qui produit Mg<sup>2+</sup> et SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> est appelé sel 2 : 2. NaHPO<sub>4</sub>, qui produit Na<sup>+</sup> et HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> est appelé sel 2 : 1. Les produits non ioniques ou portant un nombre égal de charges négatives et positives (ex. acides aminés) ne contribuent pas à la force ionique d'une solution.

## Verrerie utilisée aux travaux pratique de Biochimie (– Revenir au Sommaire)



### VOLUMETRIE

Pour mesurer des volumes de liquides titrés, on utilise des récipients jaugés ou gradués. Les récipients jaugés sont les fioles et les pipettes ; les récipients gradués sont les burettes et les éprouvettes. Dans le cas des burettes comme dans celui des pipettes, la surface libre du liquide forme un ménisque. C'est la partie inférieure du ménisque qui doit être utilisée pour repérer le niveau du liquide : la figure n°1 montre que le ménisque doit être tangent au trait de jauge. Cependant, avec les solutions d'iode ou de permanganate qui sont fortement colorées, on ne peut pas distinguer le ménisque ; la surface libre de liquide semble horizontale, et c'est elle que l'on amène en coïncidence avec le trait de jauge (figure n°2).

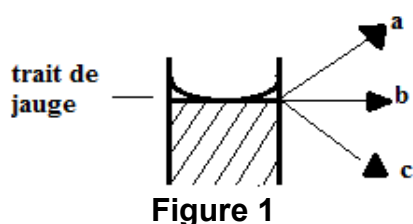


Figure 1

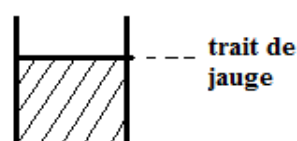


Figure 2

Pour régler l'écoulement d'une pipette, on bouche l'orifice supérieur avec l'index : c'est le seul doigt qui permet un réglage précis. D'autre part, il doit rester sec ; le doigt mouillé fait ventouse, et il est alors impossible de régler l'entrée d'air (figure n°3). L'écoulement d'une pipette se fait à l'air libre ; il ne faut jamais souffler dedans. Quand on vérifie l'affleurement du ménisque, ou bien quand on vidange la pipette, on doit toujours appuyer la pointe de la pipette sur la paroi du récipient (figure n°4). Il ne doit pas se former de bulle d'air sur les parois du récipient, ce qui entraînerait une source importante d'erreur.

La mesure précise d'un volume se fait entre deux graduations. Eviter les mesures faites entre une graduation et le bout de la pipette.

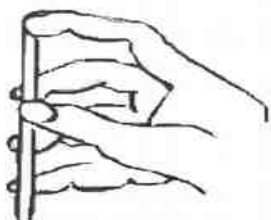


Figure 3



Figure 4

Lecture de la burette et de la pipette : attention aux erreurs de parallaxe ; sur la figure n°1, « a » et « b » les lectures sont fausses, « c » est correcte.

Lien utile (vidéo) : <https://youtu.be/JBsQm5kY22Y>

## APPAREILLAGE ET MESURES ([– Revenir au Sommaire](#))

### A. SPECTROPHOTOMETRE

C'est la mesure de l'absorption de la lumière par des atomes ou des molécules lorsqu'on les soumet à l'action de la lumière.

#### 1. RAPPEL

##### a. Nature de la lumière

La lumière est une radiation électromagnétique caractérisée par deux aspects :

- Son aspect ondulatoire

C'est une onde désignée par sa longueur, d'où le nom de longueur d'onde. Cette longueur peut aller du nanomètre (nm) au mètre.

- Son aspect corpusculaire

La lumière transporte de l'énergie sous forme de quantas d'énergie, ou PHOTONS. Chaque photon possède une énergie :

$$E = h \gamma$$

$h$  : constante de Planck :  $6,623.10^{34}$  J.S (Joules.seconde)

$\gamma$  : fréquence de la lumière, soit  $c / \lambda$

$c$  : vitesse de la lumière

$\lambda$  : longueur d'onde

REMARQUE : si  $\lambda$  croît, alors  $\Delta E$  décroît. La lumière est donc une forme d'énergie.

##### b. Nature de la matière

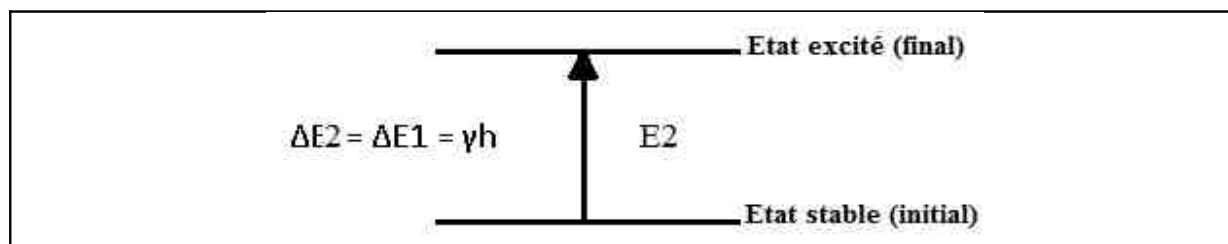
C'est également une forme d'énergie ; elle est quantifiée, c'est-à-dire que la différence d'énergie  $\Delta E$  entre 2 états ne peut prendre qu'une seule valeur.

Au niveau de l'atome, les niveaux d'énergie, ou quanta, correspondant aux états énergétiques des électrons.

#### 2. ABSORPTION DE LA LUMIERE



Pour qu'il ait absorption de la lumière, il faut que l'énergie ( $\Delta E_1$  ou quantum  $h \cdot \nu$ ) apportée par celle-ci corresponde à une différence d'énergie ( $\Delta E_2$ ) de la matière ; à ce moment là, il y a interaction entre la lumière et la matière :



Au niveau de la lumière, l'absorption de la lumière se traduit par le passage d'un état stable, ou fondamental, à un état excité, d'énergie plus élevée.

L'état excité, est un état instable ; le retour à l'état stable peut se faire de deux façons :

- En mettant de la lumière (fluorescence, phosphorescence)
- En cédant son énergie, sous forme de chaleur, au milieu.

REMARQUE : si l'absorption d'énergie donne lieu par exemple à une nouvelle conformation moléculaire, il s'agit d'une réaction photochimique. La lumière couvre un domaine d'énergie important.

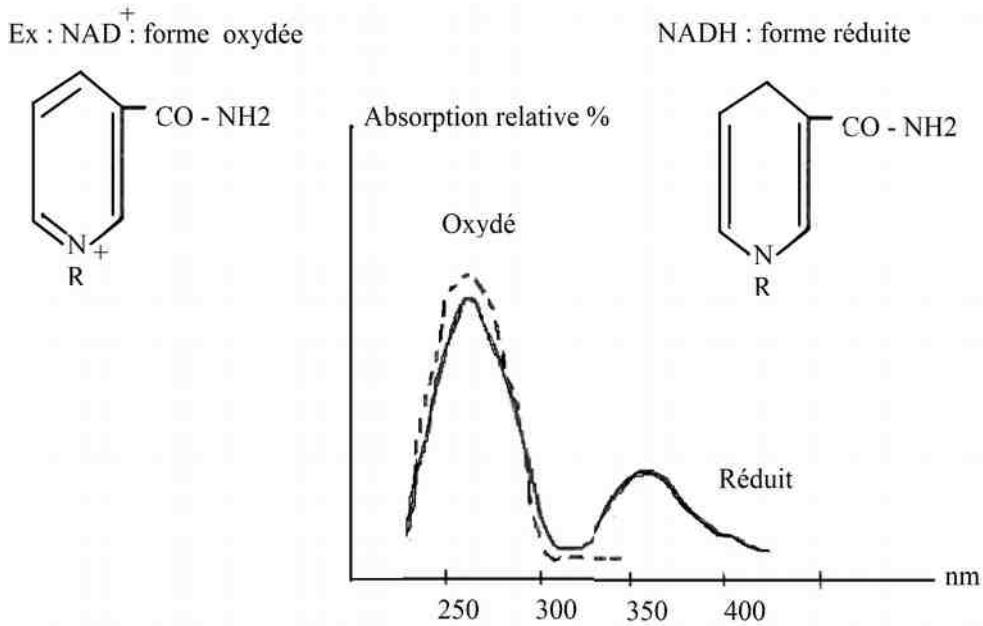
(m. u)	TYPE DE SPECTROGRAPHIE	NATURE DE LA TRANSITION
$3 \cdot 10^3$	Micro-ondes	Spectres de rotation
40	Infrarouge lointain	Spectres de vibration
0,8 ou 800 nm	Infrarouge	Spectres électroniques
0,4 ou 400 nm	Visible	
0,2 ou 200 nm	Ultraviolet	
0,01	Ultraviolet "vide"	
	Rayons X	

Le domaine de longueur d'onde le plus souvent utilisé en biochimie est compris entre 200 et 800 nm (visible et Ultraviolet), ou il s'agit de changements d'état d'énergie au niveau des électrons de la molécule (transition électronique).

### 3. INTERET DE L'ABSORPTION

L'absorption de la lumière peut être suivie grâce à un spectrophotomètre de 2 manières : sur le plan qualitatif et sur le plan quantitatif.

**a. Aspect qualitatif**



Il consiste à regarder l'absorption de la molécule étudiée en fonction de la longueur d'onde de la lumière. On obtient ainsi un spectre d'absorption : ce spectre apporte des renseignements sur la structure de la molécule.

**a. Aspect quantitatif**

On mesure à une longueur d'onde donnée, l'absorption de la lumière en fonction de la concentration de la solution. La longueur d'onde choisie correspond au maximum d'absorption de la molécule, qui a pu être déterminée grâce au spectre d'absorption de la molécule.

**\*Loi de BEER-LAMBERT**

$$I = I_0 e^{-Kcl}$$

Avec

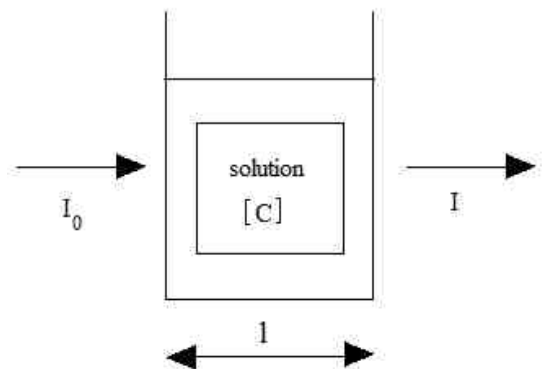
$I_0$  : intensité du faisceau lumineux incident.

$I$  : intensité du faisceau lumineux émergent.

$l$  : longueur du chemin optique.

$C$  : concentration de la molécule absorbante.

(Solution de concentration  $C$  dans une cuve de spectrophotomètre)



Donc :  $\log_{10} \frac{I_0}{I} = -Kcl$  ou  $\log_{10} \frac{I_0}{I} = Kcl.2,3 = \epsilon lc$

$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \text{Absorption ou densité optique (DO)}$

$DO = \epsilon lc$

$DO = \log \frac{I_0}{I}$  ( $T = \text{transmission}$ )

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire, quand  $C$  est exprimée en moles / litre.

- Il est constant pour une molécule donnée.

- Il s'exprime en  $\text{litre.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

### Le spectrophotomètre

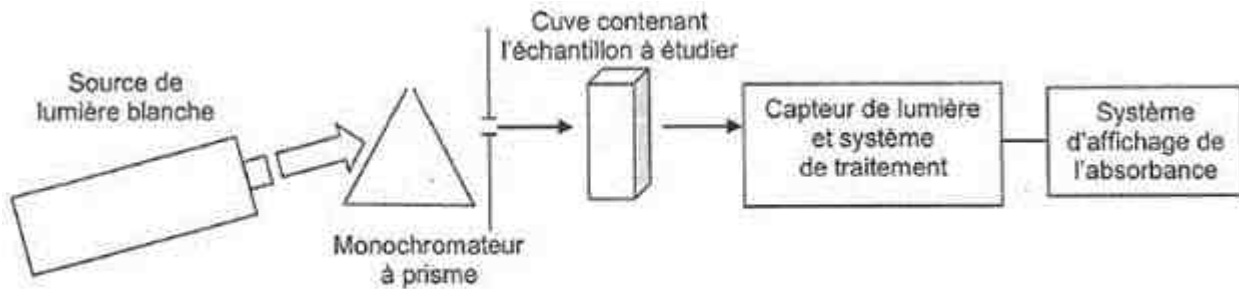
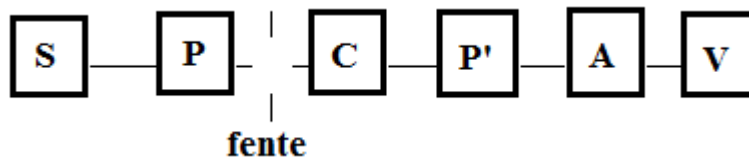


Schéma de principe d'un spectrophotomètre à prisme

### Liens utiles:

- Vidéo sur la loi de Beer-Lambert (Fr): <https://youtu.be/xwSKw5er66A>

### b. Le spectrophotomètre



S : source de la lumière polychromatique constituée par un filament de tungstène pour le visible, et par le deutérium pour l'ultra-violet.

P : monochromateur à prisme ou à réseau qui permet de sélectionner la longueur d'onde.

C : cuve de mesure de 1 cm de largeur ; elle est en verre pour le visible, et en quartz pour l'ultraviolet.

P' : photomultiplicateur, c'est une cellule photoélectrique qui débite un courant proportionnel à la lumière reçue.

A : amplificateur ; il amplifie le courant provenant de la cellule photoélectrique.

V : voltmètre ; il traduit le courant en DO.

## B. pH-METRIE : DEFINITIONS ET RAPPELS ([- Revenir au Sommaire](#))

La pH-métrie est une méthode de mesure de la concentration d'une solution en ions hydrogène ; l'appareil utilisé est le pH-mètre.

Il existe des papiers-pH, qui sont des bandelettes de papier filtre contenant une substance changeant de coloration dans une ou plusieurs zones de pH.

Cette appréciation visuelle du pH est très rapide, mais peu précise (précision de 0,5 à 1 unité pH).

Pour faciliter l'expression de la concentration en ions hydrogène, on définit le POTENTIEL-HYDROGENE :

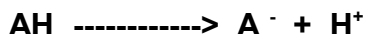
$$pH = -\log[H^+]$$

Dans le cas de l'eau pure, à 25°C, le pH est égal à 7. Par rapport à ce pH, on définit :

- Une solution ACIDE, dont le pH est inférieur à 7.
- Une solution NEUTRE, dont le pH est égal à 7
- Une solution BASIQUE, dont le pH est supérieur à 7

## 1. ACIDES FORTS

Les acides forts se dissocient totalement en solution. Soit un acide fort AH :



Si la concentration de l'acide en solution est C, alors celle des ions H<sup>+</sup> (et A<sup>-</sup>) sera donc égale à C ; par conséquent :

$$pH = -\log C$$

REMARQUE : cette égalité n'est valable que si les solutions sont concentrées ; quand la solution est fortement diluée, il faut tenir compte de l'ionisation de l'eau.

## 2. BASES FORTES

Le raisonnement est identique à celui utilisé dans le cas des acides forts. Si la concentration de la base forte est C, alors le pH de la solution sera :

$$pH = 14 + \log C$$

### REACTIONS UTILISEES EN TITREMETRIE

Elles sont très variées, mais elles doivent répondre à différentes conditions :

- La réaction chimique doit être bien déterminée et ne doit s'accompagner d'aucune réaction secondaire.
- Elle doit être complète.
- Sa durée doit être très limitée.
- Le terme de la réaction doit être facile à déterminer.

#### A. DIFFERENTS TYPES DE REACTIONS

- Réactions avec échange de protons (acidimétrie, alcalimétrie).  
Exemple : TP1 Acidimétrie du glycolle.
- Réactions avec échanges d'électrons (oxydo-réductimétrie).  
Exemple : TP lipide : dosage de l'iode par le thiosulfate.
- Réactions de combinaison entre cations et anions.
- Réactions se traduisant par la formation de composés peu solubles.
- Réactions se traduisant par la formation de complexes.  
Exemple : TP dosage des protéines : voir réaction de Biuret.

### EQUATION FONDAMENTALE DE LA TITRIMETRIE

Prenons comme exemple la neutralisation d'un acide fort A1 par une base forte B2.

Supposons connue la normalité de la base B2, soit N2. Dans le Becher se trouve un volume V1 (en ml) d'acide A1 de normalité inconnue N1.

Pour neutraliser ce volume V1, on doit verser un volume V2 (en ml) de la base B2. A la neutralisation, le nombre d'équivalents de l'acide A1 dans le volume V1 est égal au nombre d'équivalents de la base B2 dans le volume V2.

Nombre d'équivalents d'acide A1 =  $N1 V1 / 1000$ .

Les volumes V1 et V2 sont convertis en litres.

Nombre d'équivalents de base B2 =  $N2 V2 / 1000$ .

Au point d'équivalence :  $N1 V1 / 1000 = N2 V2 / 1000$ .

On en déduit la relation fondamentale de la titrimétrie :  $N1 V1 = N2 V2$

Cette formule est générale et s'applique aussi bien à la protométrie qu'à l'oxydo- réductimétrie, à condition d'exprimer les volumes V1 et V2 dans la même unité et de faire intervenir la normalité c'est-à-dire le nombre d'équivalents par litre.

Si les titres des solutions sont donnés en molarité, normalité (nombre de moles par litre), ou en concentration (nombre de grammes par litre), il est nécessaire d'écrire la réaction de neutralisation et de calculer la normalité des solutions.

## METHODE DE DOSAGE

Deux méthodes de dosage peuvent être utilisées en volumétrie, la méthode directe et la méthode indirecte.

### 1. Méthode directe

Un volume  $V_1$  d'une solution à doser (en général 10 ml), de normalité inconnue  $N_1$ , est versé, dans l'erlenmeyer.

On verse à l'aide de la burette jusqu'à la neutralisation un volume  $V_2$  de solution de normalité connue  $N_2$ .

La relation fondamentale donne :

$$N_1 V_1 = N_2 V_2 \text{ d'où } N_1 = N_2 V_2 / V_1$$

La concentration  $C$  en g/l sera égale à  $C = N_1 \times \text{Meq}$   
 $\text{Meq}$  étant la masse d'un équivalent en gramme.

### 2. Méthode indirecte

Appelée encore méthode par reste, dosage en retour, ou dosage par différence. Cette méthode est utilisée quand **la réaction ne peut s'effectuer qu'en présence d'un excès de réactif (voir TP lipide)**.

$$\begin{array}{r} I \text{ ————— } I \\ I \text{ ————— } I \\ \hline I \text{ ————— } I \end{array} \qquad \begin{array}{l} N_1 V_1 \\ N_2 V_2 \\ N_3 V_3 \end{array}$$

Dans un volume déterminé  $V_1$  de solution à doser de titre  $N_1$  inconnu, on verse un volume de solution titrée  $V_2$  de titre  $N_2$ , suffisant pour qu'il y ait un excès. On mesure cet excès à l'aide d'une autre solution titrée de volume  $V_3$ , de titre  $N_3$ .

Au point d'équivalence :  $N_1 V_1 = (N_2 V_2 - N_3 V_3)$

$$N_1 = (N_2 V_2 - N_3 V_3) / V_1$$

## CONSEILS AUX ETUDIANTS

[\(– Revenir au Sommaire\)](#)

### RECOMMANDATIONS GENERALES

- Le port de **blouse** est obligatoire pendant la séance de TP.
- Lire attentivement le texte avant d'entreprendre une expérience, et se conformer strictement aux indications données.
- Maintenir la paillasse en parfait état de propreté.
- N'utiliser que la verrerie propre. Les tubes propres sont toujours disposés dans les portoirs avec l'ouverture vers le bas.
- Ne pas déboucher plus d'un flacon à la fois ; le reboucher dès qu'on ne s'en sert plus ; les réactions obtenues seront ainsi plus fiables.
- Ne pas intervertir les pipettes ; en cas de doute, les rincer soigneusement à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée.
- Avant de verser son contenu, tenir toujours le flacon de telle sorte que l'étiquette ou l'inscription soit dans la paume de la main.
- Lors du chauffage d'un tube à essai à la flamme :
  - Ne le remplir qu'au 1/3 environ.
  - Le saisir à l'aide d'une pince en bois.

- Le chauffer en l'agitant doucement, pour éviter les projections.
- Le tenir incliné vers le mur ou une cloison de verre, ou encore du côté où il n'y a personne.
- Pour mélanger correctement plusieurs solutés dans un tube à essai, l'agiter en tapotant sa partie inférieure contre la paume de la main ; pour des volumes supérieurs à 5 ml, employer une baguette de verre ou un VORTEX.
- Toujours verser l'ACIDE dans l'eau, et non le contraire, surtout dans le cas de l'acide sulfurique.
- Lorsque la manipulation est terminée, laver et rincer la verrerie sale, nettoyer la paillasse.

### **EN CAS D'ACCIDENT**

- En cas de brûlures extérieures, suite à une projection d'acide ou de base, laver abondamment à l'eau la partie atteinte, et prévenir de suite l'enseignant.
- En cas de brûlures ou de blessures dues au contact du verre, ou en cas d'ingestion de liquide, prévenir immédiatement l'enseignant.

En résumé, pour éviter les accidents, il faut travailler avec :

- Beaucoup de soin.
- Beaucoup de propreté.
- Calme et prudence.
- A la fin du TP, laver soigneusement vos mains avant de quitter la salle.

---

## **COMPTE-RENDU**

[\(– Revenir au Sommaire\)](#)

Le compte rendu devra être remis à la fin de la séance de Travaux Pratiques. Il comprendra les paragraphes suivants :

### **A. BUT**

Indiquer clairement ce que l'on cherche à déterminer en 1 ou 2 phrases au maximum.

### **B. PRINCIPE**

Exposer brièvement dans cette partie la théorie, ou la méthode, sur laquelle est basée la manipulation.

### **C. COURBES ET GRAPHES**

Ecrire le titre en haut au milieu de votre papier millimétré.

Ecrire l'échelle choisie en haut et à droite de votre papier millimétré. Il est important de choisir une échelle simple qui est un multiple de 1, de 2 ou de 10 (ne jamais choisir une échelle nécessitant une calculatrice).

Ecrire clairement les indications de vos axes : Abscisses et Ordonnées.

Les projections des points inconnus doivent figurer clairement sur vos courbes.

Tracer vos courbes ou graphes en essayant de les faire passer à proximité d'un maximum de points expérimentaux obtenus. Ces points doivent être présents clairement par une croix.

### **D. RESULTATS**

Indiquer dans ce paragraphe les valeurs expérimentales obtenues. Exposer clairement les calculs, en prenant un exemple. Mettre en évidence le résultat final.

### **E. CONCLUSIONS et/ou COMMENTAIRES**

Faire les observations, les remarques et les critiques que vous jugerez utiles, s'il y a lieu.

Paragraphe à revoir :

- La présence pendant les séances de TP est obligatoire.

- Le respect des groupes est impératif.
- Les rattrapages ne sont pas autorisés.
- La préparation des TP avant les séances pratiques est obligatoire. D'autant plus qu'un examen pratique et individuel sera organisé à la fin de l'année.
- Des interrogations écrites seront faites sur le contenu du TP à la fin de la séance, ou sur la préparation de celui-ci au début de la séance.

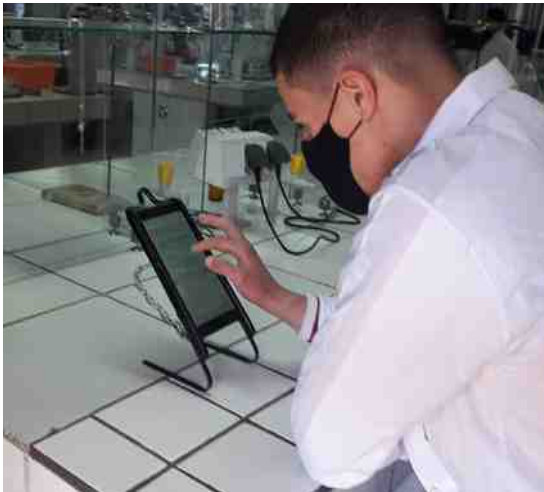
Pour les séances des TP, chaque étudiant doit se munir :

- De 2 feuilles complètes de papiers millimétrés.
- De 2 papiers ministre.
- D'une feuille grand format pour l'interrogation écrite.
- Des feuilles de brouillon.
- D'une montre chronomètre et d'une calculatrice.
- D'un marqueur indélébile à l'eau, stylo, crayon, gomme et règle.


## CONTROLE CONTINU

[\(- Revenir au Sommaire\)](#)

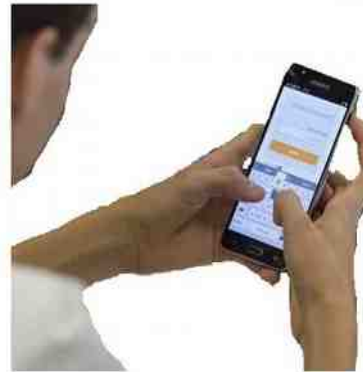
Le contrôle continu est effectué au cours des séances de TP sous forme de 'Quiz' réalisé sur la plateforme **ecampus-fssm.uca.ma** de l'Université Cadi Ayyad.



**mobile quiz**

Connection au wifi: 	Id: <b>TP13</b> ou <b>TP13_2</b> Pass: .....
--	---

<https://ecampus-fssm.uca.ma>



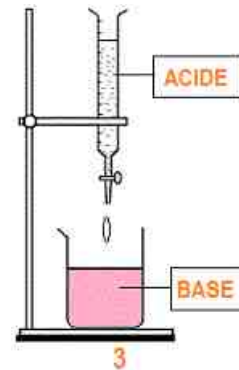
# TP n°1 : ETUDE DES LIPIDES [\(- Revenir au Sommaire\)](#)

## DETERMINATION DE QUELQUES CONSTANTES DES LIPIDES.

### ✓ RAPPELS

Les lipides sont des biomolécules organiques insolubles dans l'eau et extractibles des cellules et des tissus par des solvants tels que le chloroforme, l'éther ou le benzène. Les lipides peuvent être classés en :

- Lipides saponifiables contenant des acides gras tels que les acylglycérols, les phosphoglycérides et les cires. Ils sont dits saponifiables puisqu'ils fournissent des savons après hydrolyse alcaline.
- Lipides insaponifiables ne contenant pas d'acides gras. On en distingue deux grands types : les stérols et les terpènes.



Une huile alimentaire de bonne qualité est constituée de plus de 98% de triglycérides. Ceux sont des tri-esters de glycérol et d'acides gras. On distingue les triglycérides homogènes et les triglycérides hétérogènes.

- **Définition de l'indice d'acidité** : c'est la quantité en mg de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1 g de corps gras.

Il permet de déterminer le degré d'altération des huiles alimentaires.

- **Définition de l'indice de saponification** : c'est la quantité en mg de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras provenant de l'hydrolyse de 1 g de corps gras.

Il permet de classer les huiles en fonction de la longueur des chaînes d'acides gras qui les composent.

### ✓ OBJECTIFS DU TP

- Evaluer la qualité de deux huiles alimentaires.
- Déterminer le poids moléculaire des triglycérides constituant ces deux huiles.

### ✓ CONNAISSANCES REQUISES

La réalisation de ce TP nécessite une bonne compréhension de :

- Cours relatifs aux lipides (triglycérides, estérification des acides gras et saponification).
- Notions de molarité et normalité.
- Titrimétrie et dosage en retour.
- Précisions des mesures.

### ✓ MATERIEL A VOTRE DISPOSITION

- **Sur votre paillasse**
  - Solution de KOH alcoolique 0,5 N.
  - Solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5N.
  - Burette d'une capacité totale de 50 ml.
  - Pipettes de 1,2 et 10 ml.
  - Béchers de 100 ml.
  - Pissette d'eau distillée.
  - 2 tubes à vis (**pour la détermination de l'indice de saponification**).



○ **Sur la paillasse latérale**

- Bombonne « eau distillée ».
- Flacon contenant l'huile A.
- Flacon contenant l'huile B.
- Vortex.
- Bain marie bouillant.

○ **Sur la paillasse centrale**

- Flacon contenant une solution de phénophtaléine.

✓ **MATERIEL PERSONNEL INDISPENSABLE**

- Calculatrice.

✓ **PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

**1- Détermination de l'Indice de saponification :  $I_s$**

A un poids déterminé de corps gras, on ajoute un volume connu et en excès de solution titrée de KOH alcoolique. Après chauffage, il y a hydrolyse alcaline. Les acides gras libérés se combinent avec la potasse pour donner un savon. En dosant la quantité de KOH qui reste, on en déduit celle ayant réagi avec la matière grasse.

**ATTENTION : on ne travaillera que sur l'huile B. Faire 2 dosages.**

- Dans un tube à vis, pipeter exactement 0,6 ml d'huile ( $m = 0,5$  g).
- Ajouter exactement 6 ml de KOH alcoolique 0,5 N.
- Boucher efficacement le tube à vis. Agiter à l'aide du Vortex.
- Mettre les tubes au bain-marie bouillant, en agitant de temps en temps, jusqu'à complète disparition de l'huile (environ 30 min).
- Laisser refroidir. Transvaser dans un bécher et récupérer ce qui reste dans le tube en rinçant celui-ci avec 5 ml d'eau distillée.
- Ajouter 2 gouttes de phénophtaléine (coloration rose violacée).
- Titrer l'excès de KOH par  $H_2SO_4$  0,5 N (burette). Noter le volume  $V_E$ .
- Faire un témoin contenant 6 ml de KOH. Noter le volume  $V_T$ .

Lien utile (vidéo): <https://youtu.be/axzLusOab7E>

**2- Détermination de l'Indice d'acide :  $I_A$**

A un poids déterminé de corps gras, on ajoute un volume connu et en excès de solution titrée de KOH alcoolique. Une partie de KOH neutralise les acides gras libres. se combinent avec la potasse pour donner un savon. En dosant la quantité de KOH qui reste, on en déduit celle ayant réagi avec la matière grasse.

**ATTENTION : on travaillera sur 2 huiles A et B. Faire 2 dosages pour chaque huile.**

**Chaque étudiant doit mentionner l'huile sur laquelle il a travaillé**

- Pipeter exactement 2 ml d'huile ( $m = 1,66$  g) dans un bécher.
- Ajouter 6 ml de KOH alcoolique 0,5 N ; agiter pendant 30 s.
- Ajouter 2 gouttes de phénophtaléine.
- Titrer l'excès de KOH par  $H_2SO_4$  0,5 N.
- Faire deux témoins contenant 6 ml de KOH. Noter le volume  $V_T$ .
- Calculer les indices d'acide et de saponification des deux huiles étudiées.
- Comparer les résultats obtenus pour les deux huiles. Donner vos conclusions.
- En supposant que ces huiles sont constituées uniquement de triglycérides homogènes, calculer le poids moléculaire de ces triglycérides.



**4. Calcul du poids moléculaire :**  
**(Démontrer la relation donnant  $I_s$  en fonction du poids moléculaire)**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**PM de A = .....**

**PM de B = .....**

**Commentaire sur les poids moléculaires :**

.....  
.....  
.....  
.....

# CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'EXTRAITS LIPIDIQUES

[\(- Revenir au Sommaire\)](#)

## ✓ OBJECTIFS

Comparer les lipides extraits d'une graine oléagineuse par deux solvants différents.  
Séparer les lipides par chromatographie sur couche mince (CCM).

## ✓ DOCUMENTATION

La réalisation de cette fiche nécessite une bonne compréhension du :

Chapitre I : Notions générales en biochimie structurale.

Chapitre II : Précision des mesures.

Chapitre V : Chromatographie.

Chapitre VII : Centrifugation.

Chapitre IX : Recommandations générales.

## ✓ MATERIEL A VOTRE DISPOSITION

### ○ Sur votre paillasse

- Solution étalon contenant un stérol.
- Solution contenant des phospholipides.
- Flacon contenant de l'hexane.
- Flacon contenant le mélange de Folch (chloroforme-méthanol 2 : 1) (**toxique**)
- Deux mortiers et leur pilon.
- Pipettes de 10 ml.
- Micropipettes ou seringues :  
(Chacune d'elles est réservée spécifiquement au dépôt d'une seule solution étalon).
- 1 Plaque de CCM de gel de silice (CCM : chromatographie sur couche mince).
- 2 tubes de centrifugation eppendorf (2 ml).
- Cuve de chromatographie contenant du chloroforme (**toxique**)

### ○ Sur la paillasse latérale

- Centrifugeuse pour tubes eppendorf.

### ○ Sur la paillasse centrale

- Echantillon de graines oléagineuses.

### ○ Sous la hotte aspirante

- Cuve de révélation saturée en vapeur d'iode (**toxique**).

## ✓ MATERIEL PERSONNEL INDISPENSABLE

- Marqueur noir indélébile.
- Crayon et règle.

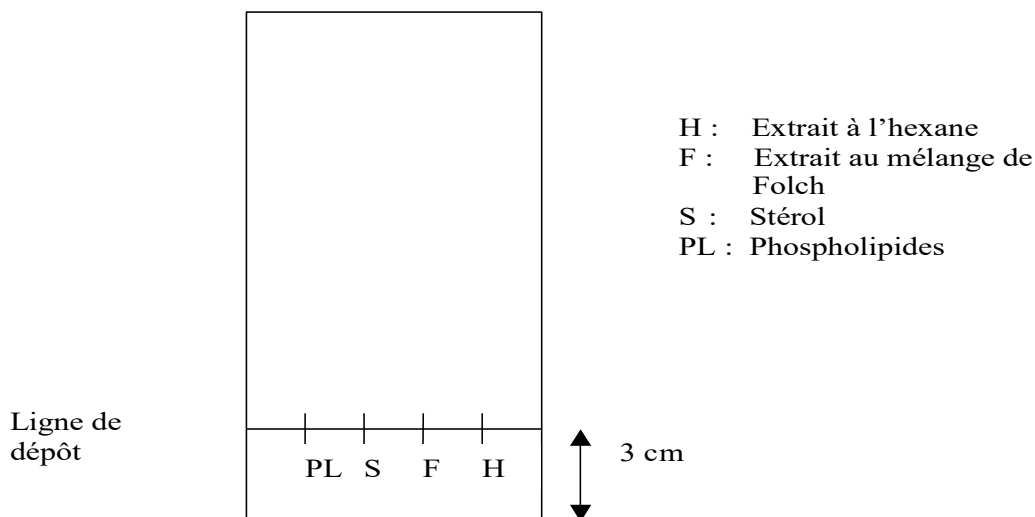
## ✓ PROTOCOLE EXPERIMENTAL

**N.B. : Un étudiant réalisera l'extraction avec l'hexane, l'autre effectuera l'extraction avec le mélange de Folch.**

- Décortiquer 20 graines de tournesol et mettre 10 graines dans chaque mortier.
- Ajouter 10 ml d'Hexane dans le premier mortier et 10 ml du mélange de Folch dans le

deuxième mortier.

- Broyer pendant 10 minutes (**jusqu'à obtention d'une poudre fine**).
- Transvaser une partie du surnageant dans deux tubes à centrifuger (un pour l'hexane et l'autre pour le Folch). **Eviter de verser les débris dans les tubes à centrifuger.**
- Centrifuger à 4000 tours par minute pendant 10 minutes.
- La séparation par Chromatographie sur Couche Mince sera réalisée sur des plaques en verre tapissées d'une fine couche de silice. **Eviter de toucher la silice avec les doigts** (risque de dépôt de matière grasse = empreinte). A trois centimètre du bord inférieur de la plaque, tracer **doucement à l'aide d'un crayon**, une ligne droite **sans décoller la silice**. Placer sur cette ligne quatre croix à 1 cm d'intervalle. (Voir schéma ci-dessous).
- A l'aide d'une seringue, déposer sur la plaque au niveau des repères, **une goutte** de chaque extrait (surnageants de la centrifugation). Déposer également une goutte du témoin pour les stérols (cholestérol) et une goutte du témoin pour les phospholipides (mélange de phospholipides).  
**Afin d'éviter les contaminations, utiliser pour chaque dépôt la seringue appropriée.**
- Placer la plaque dans la cuve de développement contenant le chloroforme comme phase mobile.
- Laisser migrer la phase mobile jusqu'à 3 cm du bord supérieur puis retirer la plaque et la laisser sécher sur la paillasse pendant 15 minutes.
- Placer la plaque dans la cuve de révélation saturée à la vapeur d'iode.
- Après 15 à 20 minutes, retirer la plaque et entourer les spots avec un crayon.



### Schéma de la plaque de CCM

Vidéo : <https://youtu.be/cs0Dey7hZi8>

### Questions :

1. Reproduire sur une feuille le chromatogramme obtenu et identifier les différents composés contenus dans les deux extraits.

Quelles conclusions pouvez-vous tirer de cette expérience ?



# TP N° 2. ETUDE DES GLUCIDES

(– [Revenir au Sommaire](#))

## ✓ **RAPPELS**

### Généralités

Les glucides, encore appelés glucides ou hydrates de carbone  $C_n(H_2O)_n$ , sont des composés comportant de nombreux groupements hydroxyles (-OH) responsables de leur caractère très hydrophile. Ce sont des polyols. La présence de groupement carbonyle (-C = O), aldéhyde ou cétonique leur confère un caractère réducteur. Ils comprennent 2 grands groupes de substances :

- **Les oses** : ce sont des polyalcools. Ils ont en outre soit une fonction aldéhydrique, soit une fonction cétonique. Ils ne sont pas hydrolysables en milieu faiblement acide. Suivant le nombre de leurs atomes de carbone on trouve : trioses, tétroses, pentoses, hexoses.
- **Les osides** : ce sont des glucides qui libèrent par hydrolyse en milieu faiblement acide un nombre variables de molécules d'oses.

### Méthodes d'analyses des substances glucidiques

En plus des méthodes physiques (pouvoir rotatoire, mutarotation, analyses chromatographiques) et des méthodes biologiques (réactions enzymatiques), les glucides inconnus peuvent être identifiés à l'aide de réactions chimiques qualitatives caractéristiques selon les étapes suivies dans la figure A. Ces réactions sont détaillées dans la deuxième partie de ce TP.

## ✓ **OBJECTIFS DU TP**

Ce TP comprend deux parties :

- hydrolyse acide des osides.
- identification des glucides par le biais de leurs réactions physico-chimiques.

## ✓ **CONNAISSANCES REQUISES**

La réalisation de ce TP nécessite une bonne compréhension de :

- Cours relatif aux glucides
- Précisions des mesures

## **A. PARTIE 1 : HYDROLYSE ACIDE DES OSIDES**

- ✓ En milieu acide et à chaud les liaisons osidiques qui lient les oses dans un oside sont rompues. Nous étudierons cette hydrolyse pour deux glucides : le saccharose et l'amidon.

## ✓ **MATERIEL A VOTRE DISPOSITION**

### ○ **Sur votre paillasse**

- Tubes à essai
- Pipettes de 1, 5 et 10 ml
- Bêchers de 100 ml
- Pissette d'eau distillée
- Solution de saccharose 0,3 M

- Solution d'amidon (empois d'amidon)
  - **Sur la paillasse latérale**
- Bain-marie à 100°C
- Bombonne « eau distillée »
- Réactif à la liqueur de Fehling : 2 flacons A et B
- Lugol
  - **Sous la hotte aspirante**
- Acide sulfurique 0,2 N

✓ **PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

**3- Cas du saccharose :**

L'hydrolyse du saccharose sera mise en évidence par la réaction à la liqueur de Fehling. Elle se déroule en deux étapes.

- **Hydrolyse acide**

**Mode opératoire :**

	Tube expérimental	Tube témoin
Saccharose 0,3 M (mL)	2	2
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 N (mL)	1	0
H <sub>2</sub> O (mL)	0	1
Temps de chauffage à 100°C (min)	15	15
Résultat	Hydrolysats 1	Hydrolysats 2

- **Vérification du pouvoir réducteur des hydrolysats**

Pour mettre en évidence le saccharose hydrolysé, on utilisera la réaction à la **liqueur de Fehling** : les glucides réducteurs libérés par l'hydrolyse du saccharose réduisent l'hydroxyde cuivrique en oxyde cuivreux insoluble et de coloration rouge brique. On réalise l'expérience selon le tableau :

	Tube Hydrolysats 1	Tube Hydrolysats 2
Hydrolysats 1 (mL)	1	0
Hydrolysats 2 (mL)	0	1
Solution A de la L. Fehling (mL)	1	1
Solution B de la L. Fehling (mL)	1	1
Temps de chauffage à 100°C (min)	2	2
Présence de précipité rouge	?	?

**4- Cas de l'amidon :**

L'amidon est un mélange d'amylose et d'amylopectine. Soumis à l'hydrolyse acide, il se scinde en molécules de plus en plus courtes (dextrines, maltose puis glucose). Chacune de ces molécules donne une coloration différente avec l'iode, ce qui permet de suivre l'hydrolyse de l'amidon.

**Mode opératoire :** l'amidon, étant insoluble à froid, la solution qui vous est fournie a été préparée à chaud (empois d'amidon). Lien utile (vidéo) : [https://youtu.be/7ABk\\_TdtKQA](https://youtu.be/7ABk_TdtKQA)

- Préparez une série de tubes comme c'est indiqué dans les tableaux ci-dessous :



## SUIVI DE L'HYDROLYSE DE L'AMIDON

	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5
Amidon Non Acidifié (ml)	2	0	0	0	0
Amidon Acidifié (ml)	0	2	2	2	2
Temps d'incubation à 100°C (min)	0	10	20	30	50
Lugol (gouttes) une fois tous les tubes sont tous retirés du bain-marie	2	2	2	2	2

### ✓ Exploitation des Résultats expérimentaux

- Observez la gamme des colorations dues aux produits intermédiaires de l'hydrolyse de l'amidon.

## Hydrolyse acide du Saccharose

Tube	Formation de précipité rouge	Déductions
Témoin		
Expérimental		

## Hydrolyse acide de l'Amidon

Tube	Couleur	Déductions
1		
2		
3		
4		
5		

## B. PARTIE 2 : IDENTIFICATION DES GLUCIDES PAR LE BIAIS DE LEURS REACTIONS PHYSICO-CHIMIQUES.

On se propose d'identifier deux glucides inconnus à l'aide de réactions chimiques qualitatives caractéristiques choisies en fonction des propriétés chimiques des oses et des osides. Ces différentes réactions sont résumées dans la Figure A.

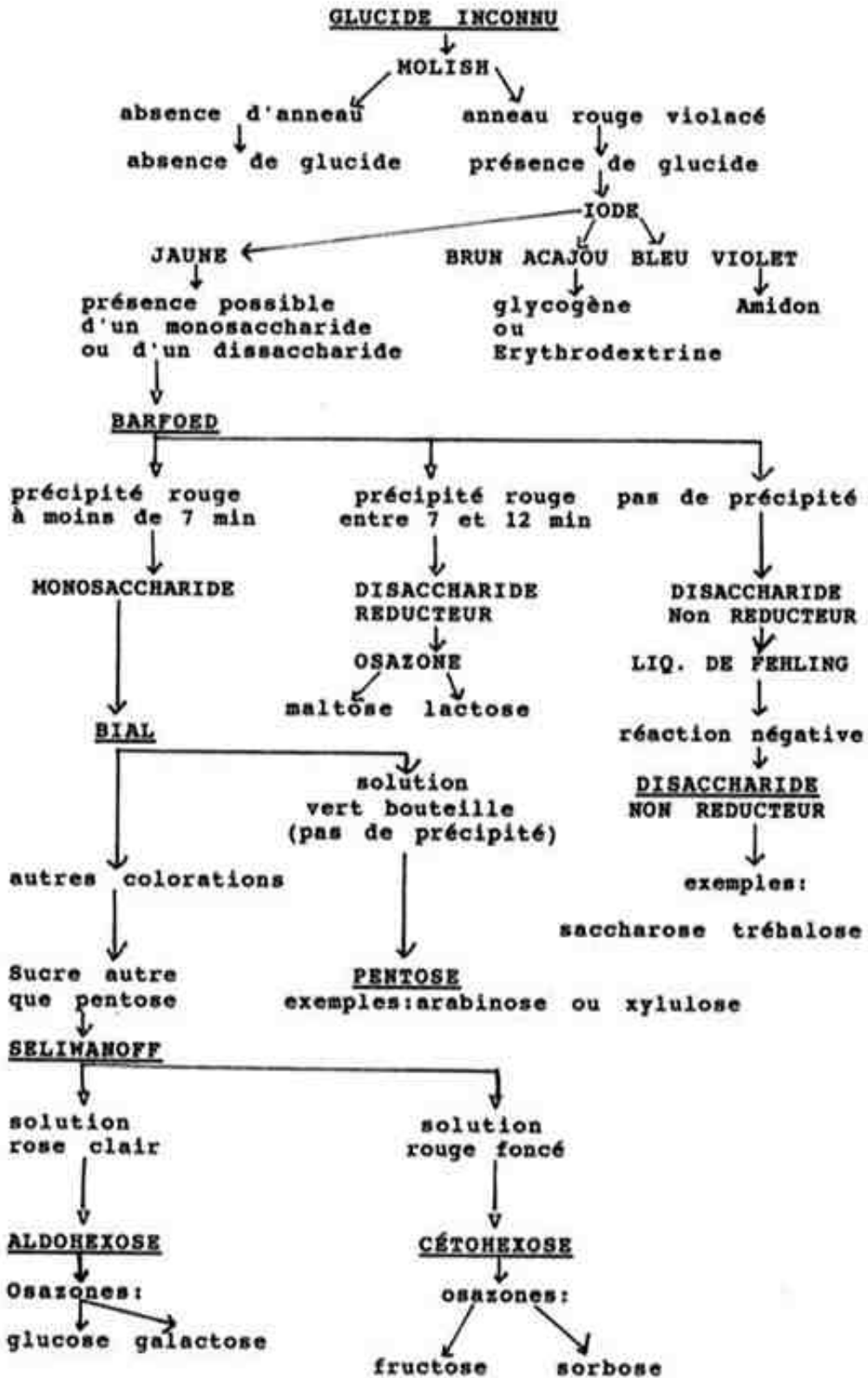
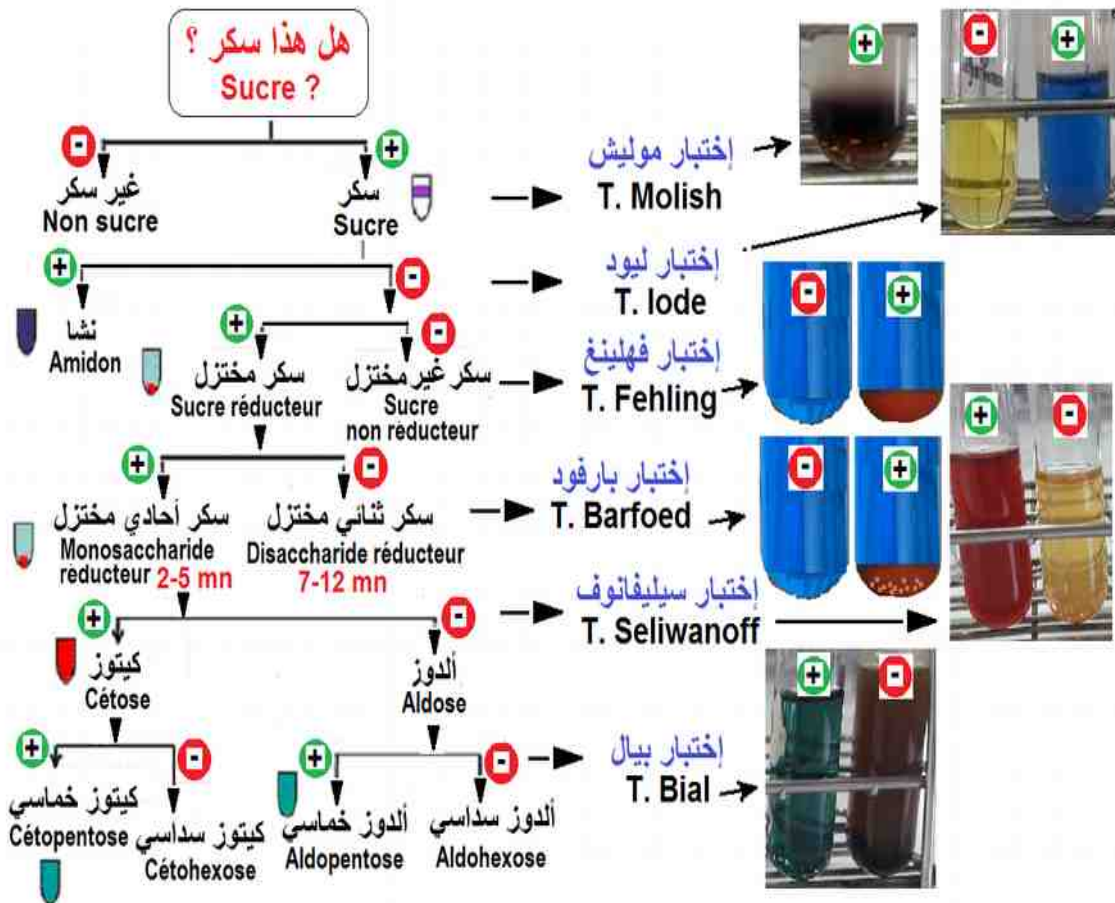


Figure A : Schéma général de l'identification des glucides.



## ✓ MATERIEL A VOTRE DISPOSITION

### ○ Sur votre paillasse

- Bain-marie à 100°C (récipient en métal chauffé au bec bunsen)
- Tubes à essai
- Pipettes de 1, 5 et 10 ml
- Béchers de 100 ml
- Pissette d'eau distillée
- 2 Flacons « sucre n° ..... » : solutions de glucides inconnus à 5 % (p/v)
- Flacon « HCl 15% (v/v)»
- Flacon « Réactif iodo-ioduré » : 1 g d'iode et 2 g de KI
- Flacon « Barfoed » : réactif de Barfoed
- Flacon « Résorcinol » : réactif de Séliwanoff
- Flacon «Chlorure ferrique»
- Flacon « alpha naphtol »

### ○ Sur la paillasse latérale

- Bombonne « eau distillée »
- Microscope avec 2 lames d'osazones à observer
- Réactif à la liqueur de Fehling : 2 flacons A et B

Lien utile (vidéo Fr) : <https://youtu.be/aJQVK3wQzOs>

Vidéo Ar : <https://youtu.be/pCcvYEal49c>

○ **Sous la hotte aspirante**

- Acide chlorhydrique concentré
- Acide sulfurique concentré
- Réactif de Bial

✓ **PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

**ATTENTION :**

*Les deux glucides sont désignés par un code que vous devez noter sur votre compte-rendu et faire correspondre à vos résultats.*

*Il faut suivre les étapes d'identification indiquées sur la figure A en commençant par la réaction avec l'iode. Noter le résultat obtenu à chaque fois.*

**1. Réaction de Molish**

En milieu acide concentré et à chaud, les oses se transforment en Furfural et Hydroxyméthylfurfural par cyclisation et déshydratation. Ces dérivés ont la propriété de réagir avec les phénols comme  $\alpha$ -naphtol pour donner des colorations caractéristiques. Dans le cas de la réaction avec  $\alpha$ -naphtol la coloration est un anneau rouge violacé.



المسكريات . إختبار (+) موليش  
Glucides. Test (+) de Molish

**Mode opératoire :**

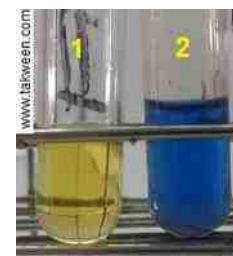
- Introduire 1 ml de la solution de sucre à 5 % (p/v)
- Ajouter 2 ou 3 gouttes de alpha naphtol
- Agiter au vortex
- Ajouter 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré

**2. Réaction avec l'iode**

La coloration obtenue est due aux phénomènes de résonance qui se produisent quand les atomes d'iode viennent se placer au niveau de l'axe des portions hélicoïdales de macromolécules (amidon par exemple) ou sur les doubles liaisons des composés biologiques tels que les acides gras insaturés.

**Mode opératoire :**

- > Introduire 2 ml de la solution de sucre à 5 % (p/v)
- > Ajouter 0,2 ml d'HCl à 15 % (v/v)
- > Ajouter 1 ou 2 gouttes du réactif iodo-ioduré (Eviter un excès d'iode qui masquerait le virage de la teinte).



إختبار اليود للكشف عن النشا  
Test à l'iode pour la détection de l'amidon

### 3. Réaction à la liqueur de Fehling

Les glucides ont la capacité de réduire les solutions de sels métalliques quand la fonction hémi-acétal est libre. Les propriétés réductrices des sucres ne se manifestent cependant qu'à pH alcalin et, dans ces conditions, les ions  $\text{Cu}^{++}$  et  $\text{Ag}^+$  forment avec les ions  $\text{OH}^-$  des hydroxydes insolubles. Pour les maintenir en solution en dépit de l'alcalinité du milieu, on ajoute une substance qui forme avec eux un ion complexe, tel que le tartrate ou le citrate pour  $\text{Cu}^{++}$  et  $\text{NH}_3$  pour  $\text{Ag}^+$ . Les différents réactifs utilisés contiennent donc tous un sel de métal oxydant, une base et une substance complexant le métal.

Dans le cas de la réaction à la liqueur de Fehling, le mélange d'une solution alcaline de tartrate double de sodium et de potassium (solution A) avec une solution saturée de sulfate de cuivre (solution B) produit une solution alcaline d'hydroxyde cuivrique. A chaud, les sucres réducteurs réduisent cet hydroxyde cuivrique en oxyde cuivreux insoluble et de coloration rouge brique.

#### Mode opératoire :

- Mettre dans un tube à essai propre 0,5 ml de solution A et 0,5 ml de solution B
- Ajouter 1 ml de solution de sucre à 1 % (p/v) (penser à la dilution)
- Homogénéiser le mélange de votre tube
- Mettre celui-ci au bain-marie. Arrêter de chauffer dès que le précipité apparaît. Sinon, laisser au bain-marie pendant au moins 12 min.

### 4. Réaction de Barfoed

Le réactif de Barfoed est une solution saturée en acétate de cuivre (forme cuivrique soluble donnant la coloration bleue). En présence d'un sucre réducteur et à chaud, il y a formation d'oxyde cuivreux rouge brique insoluble. La réaction est plus rapide quand le sucre réducteur en question est un ose (moins de 7 minutes) et plus lente quand il s'agit d'un disaccharide réducteur (7 à 12 minutes).



#### Mode opératoire :

- Introduire dans un nouveau tube 2,5 ml de réactif de Barfoed
- Ajouter 0,5 ml de solution de sucre à 5 % (p/v)
- Homogénéiser le mélange en agitant votre tube
- Placer le tube au bain-marie bouillant (temps=0)
- Surveiller et noter le temps d'apparition du précipité. Arrêter de chauffer dès que celui-ci apparaît, sinon attendre au moins 12 min.

### 5. Réaction de Séliwanoff

En présence d'acide chlorhydrique et à chaud, les hexoses donnent naissance, par déshydratation et cyclisation, au furfural. Celui-ci, se condense avec le résorcinol appelé aussi réactif de Séliwanoff et donne un produit de couleur rose (cas des aldohexoses) ou rouge cerise (cas des cétohexoses).

#### Mode opératoire :

- > Mettre dans un tube à essai 1,5 ml de sucre à 1 % (p/v)
- > Placer votre tube sous la hotte et ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré
- > Rajouter 1 ml de solution alcoolique de résorcinol (réactif de Séliwanoff)
- > Homogénéiser avant de mettre le tube au bain-marie bouillant pendant 3 min au maximum.
- > Retirer votre tube dès que la coloration apparaît



## 6. Réaction de Bial

En présence d'acide chlorhydrique et à chaud, les pentoses donnent naissance, par déshydratation et cyclisation, au furfural. Celui-ci, se condense avec l'orcinol et donne, en présence de chlorure ferrique, un produit de couleur vert bouteille.

### Mode opératoire :

- > Mettre dans un tube à essai 2 ml de sucre à 1% (p/v)
- > Placer votre tube sous la hotte et ajouter 2 ml de réactif de Bial
- > Homogénéiser l'ensemble en agitant votre tube
- > Mettre celui-ci au bain-marie bouillant pendant 6 min
- > Ajouter ensuite 4 gouttes de chlorure ferrique
- > Agiter et observer



### **Exploitation des résultats**

- D'après les résultats obtenus et en vous aidant de la figure A, identifiez la nature des deux glucides inconnus. Justifiez votre réponse.

**COMPTE RENDU  
REACTIONS AVEC DES COMPOSES BIOLOGIQUES**

Nom	Prénom	Groupe TP	Table N°	Note

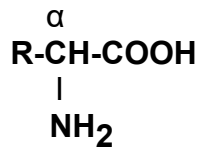
Réactions	Résultats	Déductions
<b>Molish</b>		
Sucre 1 :	.....	.....
Sucre 2 :	.....	.....
<b>Iode</b>		
Sucre 1 :	.....	.....
Sucre 2 :	.....	.....
<b>Barfoed</b>		
Sucre 1 :	.....	.....
Sucre 2 :	.....	.....
<b>Liqueur de Fehling</b>		
Sucre 1 :	.....	.....
Sucre 2 :	.....	.....
<b>Bial</b>		
Sucre 1 :	.....	.....
Sucre 2 :	.....	.....
<b>Seliwanoff</b>		
Sucre 1 :	.....	.....
Sucre 2 :	.....	.....

## TP 2 (suite) : TITRATION DE LA GLYCINE

[\(- Revenir au Sommaire\)](#)

### ✓ RAPPELS

Les acides aminés comportent généralement deux fonctions : une fonction acide carboxylique (-COOH) et une fonction amine primaire (-NH<sub>2</sub>) en position α par rapport au carboxyle. Ils répondent tous à la formule générale suivante :



Les acides aminés diffèrent entre eux par la nature de leur radical R. C'est une chaîne latérale de polarité variable qui peut parfois comporter une fonction carboxylique ou amine supplémentaire. On parle alors d'acide aminé acide ou basique. Pour le glycolle (R = H). Il s'agit d'un acide aminé neutre.

Le glycolle possède 2 groupes ionisables : (le carboxyle et l'amine). Il s'agit d'une molécule amphotère. Lorsqu'on fait passer une solution d'un acide aminé neutre d'un pH acide à un pH basique (ou inversement), on passe successivement par différents états d'équilibre entre les formes d'ionisation possibles de l'acide aminé.

### ✓ OBJECTIFS DU TP

- Tracer la courbe de titration d'une solution de Glycolle (Glycine), de molarité connue.
- Déterminer les constantes d'ionisation pK et pHi.
- Dédire les différentes formes d'ionisation en fonction du pH de la solution.

### ✓ CONNAISSANCES REQUISES

La réalisation de ce TP nécessite une bonne compréhension de :

- Cours relatifs aux acides aminés, en particulier les différentes formes d'ionisations (acide, basique ou neutre).
- Réactions acido-basiques, mesure du pH et solutions tampons.
- Précisions des mesures.

### ✓ MATERIEL A VOTRE DISPOSITION

#### ○ Sur votre paillasse

- pH-mètre muni d'une électrode combinée en verre.
- 2 solutions tampons pH 7 et pH 4 pour l'étalonnage du pH-mètre.
- Bloc d'agitation magnétique.
- Barreau aimanté (faire attention à ne pas le perdre en versant vos solutions dans l'évier).
- Burette d'une capacité totale de 50 ml.
- Bécher de 100 ml.
- Pissette d'eau distillée.
- Flacon « X1 » : 1<sup>ère</sup> solution d'acide aminé à étudier (0,5 M)
- Flacon « X2 » : 2<sup>ème</sup> solution d'acide aminé à étudier (0,5 M)
- Flacon « HCl 0,25 N » : Acide chlorhydrique 0.25 N.



○ **Sur la paillasse latérale**

→ Bombonne « eau distillée ».

✓ **MATERIEL PERSONNEL INDISPENSABLE**

- > Feuilles de papier millimétré
- Calculatrice
- Nécessaire de dessin (crayon, gomme, règle).

✓ **PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

**4. Etalonnage du pH-mètre**

- Etalonnez votre appareil en suivant les étapes décrites dans la fiche technique mise à votre disposition. Un premier étalonnage sera réalisé en présence de l'enseignant.

**4. Titration de la solution d'acide aminé X1**

- Vider entièrement votre burette, rincer la avec un peu (5 ml) d'acide chlorhydrique 0.25N avant de la remplir avec cette même solution.
- Mettre 40 ml de la solution d'acide aminé X1 dans un bécher propre contenant un barreau aimanté. Placer le bécher sur le bloc d'agitation magnétique.
- Introduire l'électrode propre du pH mètre dans le bécher et l'ajuster de façon à ce que le dôme plonge entièrement dans le liquide sans toucher le barreau aimanté.
- Notez la valeur du pH de départ.
- Placer votre burette contenant l'acide chlorhydrique 0.25 N au dessus du bécher.
  - Titrer par l'acide chlorhydrique 0.25 N à l'aide de la burette en ajoutant successivement des volumes égaux de 0.5 ml. Noter le pH après chaque addition d'HCl. Lorsque la titration est effectuée, vider le reste de l'HCl 0,25 N dans son flacon. Remplir la burette avec de l'eau distillée. Mettre le pH-mètre en position de veille 'stand by'. Sortir l'électrode, la rincer à l'eau distillée et la placer dans le flacon de conservation. Rendre le barreau aimanté à votre enseignant.

Lien utile (vidéo Fr, Ar) : <https://youtu.be/FRksDQQh2rM>

**3. Titration de la solution d'acide aminé X2**

- Le protocole est identique à celui réalisé pour l'acide aminé X1.

Lorsque les deux titrations sont effectuées, vider le reste de l'HCl 0.25 N dans son flacon. Remplir la burette avec de l'eau distillée. Mettre le pH-mètre en position de veille 'stand by'. Sortir l'électrode, la rincer à l'eau distillée et la placer dans le flacon de conservation. Rendre le barreau aimanté à votre enseignant.

**4. Exploitation des Résultats expérimentaux**

- Pour chaque acide aminé, séparément et sur des feuilles entières de papier millimétré, tracer les courbes de titration : pH en fonction du volume d'HCl 0.25 N versé.
- Repérer les parties des courbes présentant des points d'inflexion.
- Situer les zones tampons sur chaque courbe de titration.
- Déterminer le nombre et la nature (acide ou basique) des fonctions ionisables.
- En déduire la nature de l'acide aminé (neutre, acide ou basique).
- Situer le pHi sur la courbe. On l'obtient en traçant 2 tangentes parallèles de part et d'autre du point d'inflexion correspondant. Une droite équidistante de ces deux parallèles coupe la courbe en un point qui correspond au pHi.
- Pour chaque acide aminé, déterminer, le volume d'HCl qui a servi à neutraliser la totalité d'une fonction, de préférence graphiquement sinon par calcul théorique. Ce volume servira à situer les pK sur les graphiques.
- Ecrire les réactions d'équilibre de dissociation de ces 2 acides aminés en y portant les pK correspondant.

**COMPTE RENDU  
TITRATION ET CARACTERISATION DE DEUX ACIDES AMINES**

Nom	Prénom	Groupe TP	Table N°	Note

**Joindre vos papiers millimétrés légendés à cette feuille du compte-rendu.**

**I- Aminoacide X1 :**

Nombre de zones tampon : .....

Nombres de fonctions ionisables : .....

Nature de l'acide aminé : .....

Valeur du pHi déterminé graphiquement : .....

Volume d'HCl théorique qui a permis de neutraliser la totalité d'une fonction de l'acide aminé X1 :

.....  
.....  
.....  
.....

Valeurs des différents pK :

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Réactions d'équilibre de dissociation :

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**II- Aminoacide X2 :**

Nombre de zones tampon : .....

Nombres de fonctions ionisables : .....

Nature de l'acide aminé : .....

Valeur du pHi déterminé graphiquement : .....

Volume d'HCl expérimental qui a permis de neutraliser la totalité d'une fonction de l'acide aminé X2 :

.....  
.....  
.....  
.....

Valeurs des différents pK :

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Réactions d'équilibre de dissociation :

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

# Séparation des acides aminés par chromatographie sur papier

[\(- Revenir au Sommaire\)](#)

## But.

Le but du travail pratique réside dans la séparation des acides aminés par chromatographie de partage sur papier.

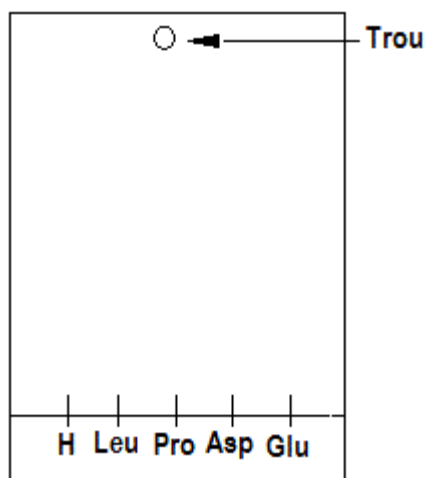
## Matériel et réactifs

- Cuve de chromatographie.
- Papier filtre Whatman N°1.
- Sèche cheveux.
- Etuve à 80°C.
- Cinq pipettes correspondant aux solutions d'acides aminés et au mélange H.
- Quatres solutions étalons d'acides aminés correspondant à la leucine (Leu, L), proline (Pro, P), acide aspartique (Asp, D) et acide glutamique (Glu, E).
- Mélange inconnu de deux acides aminés (mélange H).
- Mélange de solvants n-butanol (3v), acide acétique (3v), eau distillée (1v).
- Solution de ninydrine 0,3% préparée dans un mélange de n-butanol- acide acétique 19:1 (v/v).

## Protocole expérimental

La séparation des acides aminés par chromatographie de partage est réalisée sur une feuille de papier Whatman N° 1 de dimensions 15 cm x 8 cm. Veuillez à ne pas toucher le centre du papier avec les doigts.

- A 1,5 cm du bord inférieur du papier, tracer une ligne droite à l'aide d'un crayon. Laisser 1 cm de chaque côté du trait et marquer sur la ligne 5 points équidistants (repères de dépôt) notés **H, Leu, Pro, Asp et Glu** (voir schéma).



A l'aide d'une pipette Pasteur, déposer au niveau des repères une goutte de chacune des 5 solutions correspondant au mélange H et aux quatre acides aminés **Leu, Pro, Asp et Glu**. Pour chaque dépôt, utiliser une pipette Pasteur appropriée.

- Sécher les dépôts au sèche-cheveux.
- A l'aide d'une aiguille, faire un trou au bord supérieur du papier et y passer un fil de couture pour le suspendre dans la cuve de chromatographie.
- Introduire le papier dans la cuve de chromatographie sans qu'il touche le solvant. Fermer la cuve et laisser le papier se saturer de solvants pendant 10 minutes.
- Tremper le papier dans le mélange de solvant sur une hauteur de 1 cm.
- Laisser la migration jusqu'à 1 cm du bord supérieur du papier.
- Retirer le papier et marquer le front de migration à l'aide d'un crayon.
- Sécher complètement le papier à l'aide du sèche-cheveux.
- Sous la hotte, pulvériser la solution de ninhydrine sur le papier.
- Placer le papier 10 minutes dans une étuve à 80°C.
- Entourer les spots d'acides aminés avec un crayon.

Liens utiles. Vidéo : <https://youtu.be/anEYD0Rpwq0>

## Compte Rendu

- Schématiser le chromatogramme et annoter les différents constituants avec indication de leurs Rf.
- Comparer le pouvoir d'extraction des lipides par les deux solvants.
- Discuter l'effet de la phase mobile dans la séparation des constituants lipidiques des graines de tournesol.