

TP1 : LA SECURITE AU LABORATOIRE DE CHIMIE ET BIOCHIME

1. Introduction

Le travail dans un laboratoire de chimie et biochimie nécessite une application d'un certain nombre de règles de sécurité ; ces règles sont indispensables pour l'organisation d'un travail dans un laboratoire. Lorsque vous rentrez en salle de TP, l'étudiant devra savoir **quoi faire, savoir comment se vêtir pour une séance de TP, connaître les règles essentielles de manipulation des matériels et des produits chimiques et la verrerie couramment utilisée et savoir rédiger son compte rendu.**

2. But du TP

- ✓ Donner quelques règles de sécurité et la méthode de travail dans le laboratoire.
- ✓ Présentation de matériel de chimie et biochimie.

3. Principales règles de sécurité

- Le port d'une blouse en coton.
- N'utilisez pas des flacons mères directement, versez d'abords dans des petits bêcher
- Interdit de diriger vers soi les ouvertures d'un récipient dans lesquelles se produit une réaction.
- Ne jamais manger ou fumer dans un laboratoire.
- Ne jamais approche une flamme à des produits inflammables.
- Toute réaction avec les substances toxique ou corrosifs (solvants organique, acide et base..) doit être effectuée sous la hotte.
- Portez des lunettes dans le cas vous utilisez des rayonnements (UV, IR...).
- Ne jamais pipeter à la bouche, mais à l'aide d'une propipette.
- Ne jamais prendre les objets chauds avec la main.
- Interdit de chauffer les substances gazeuses dans un récipient bouché.

4. Méthodes de travail

- 1) Chaque étudiant doit avoir des papiers blancs pour le TP.
- 2) Toujours enregistrez les remarques essentielles (les observations /état physique/dessins..).
- 3) Vous devez écrire dans le compte rendu uniquement : **But du TP, principe, manipulation, résultats - interprétation et conclusion.**
- 4) A la fin du travail il faut toujours laver (les tubes, éprouvettes,...), et rendre le matériel dans l'ordre.
- 5) Essuyer le poste de travail et garder le bien propre.

5. Présentation de matériel de chimie et biochimie

4.1 La pipette graduée

La pipette permet de mesurer les volumes de liquide. Les pipettes s'utilisent en général avec une propipette.

	<ul style="list-style-type: none">• Verser le liquide à prélever dans un bécher.• Ajuster la propipette à la pipette.• Aspirer pour faire monter le liquide jusqu'à la graduation souhaitée.• Laisser couler le liquide dans un deuxième récipient.
---	--

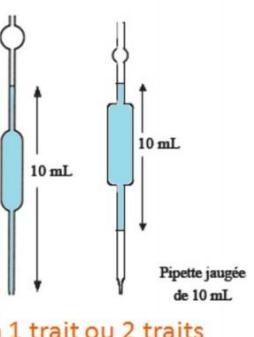
4.2 Eprouvette

	Tube allongé fermé à un bout, employé dans les expériences de laboratoire pour recueillir les liquides.
--	---

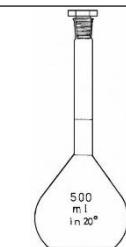
La burette

	<p>La burette permet de mesurer des volumes cumulés. La burette est principalement utilisée pour les dosages.</p>
---	---

La pipette jaugée (à un ou deux traits de jaugée)

 à 1 trait ou 2 traits	<p>La pipette jaugée permet de mesurer avec précision de petits volumes de liquides. Il existe des volumes de pipette jaugée : 2 mL, 5 mL, 10 mL et 20 mL. Il existe plusieurs tailles de pipette jaugée. La lecture : parallaxe et ménisque. La pipette jaugée s'utilise en général avec une propipette.</p>
--	---

4.3 La fiole jaugée



La fiole jaugée permet de mesurer un volume avec une bonne précision.
Ainsi, elle est utilisée pour :

- La préparation de solution de concentration donnée.
- La dilution d'une solution.
- La lecture se fait au niveau du trait de jauge.

4.4 La spatule

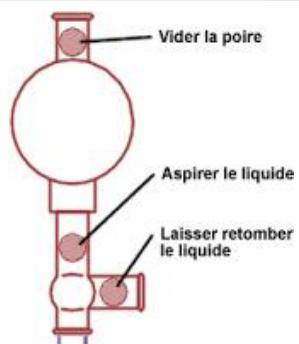


La spatule permet de prélever des échantillons de solides en poudre ou en petits morceaux.

la propipette



La propipette s'utilise avec une pipette graduée ou une pipette jaugée. Elle permet d'aspirer pour faire monter le liquide dans la pipette, de maintenir ou de laisser couler ce liquide.



Utilisation de la propipette

Préparation de la propipette : Fixer la propipette à la pipette (du côté opposé à la poire). Appuyer sur l'emplacement A et presser sur la poire pour la vider. Une pression sur l'emplacement S permet d'aspirer le liquide. Une pression sur l'emplacement E permet de laisser couler le liquide.

4.5 La pince en bois



Les pinces en bois permettent de manipuler la verrerie chaude.

4.6 Les tubes à essais

	Le tube à essais est utilisé pour les réactions faisant intervenir de petites quantités de réactifs. De plus il peut être chauffé.
--	--

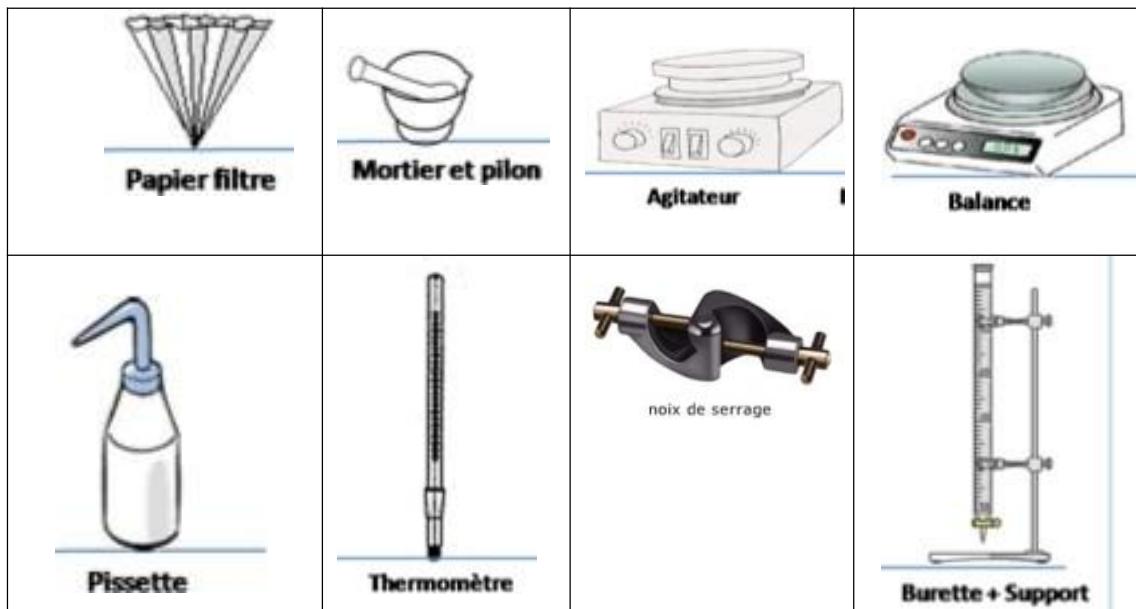
4.7 Le Bécher

	Le bécher utilisé pour : <ul style="list-style-type: none">- Entreposer des produits chimiques (avant un prélèvement par exemple).- Faire quelques réactions. En effet les graduations ne sont qu'indicatives et n'ont précises.
--	---

4.8 Erlenmeyer

	erlenmeyer à col étroit à col large à col rodé	En effet les graduations sont seulement indicatives
--	--	---

6. Autres verreries instruments



7. Les pictogrammes de sécurité dans le labo

	Mortel		Dangereux pour l'environnement
	Inflammable		Dangereux
	Comburant (Fait brûler)		Sous pression
	Corrosif		Cancérogène
	Explosif		

8. Conclusion

A la fin de chaque séance, un compte rendu lisible, clair et selon les directives mentionnées au-dessus est remis au responsable du TP avec les résultats, dessins....

9. Travail à faire

- A. Préparer un compte rendu sur toute la verrerie présente dans le laboratoire, en se référant à la fiche technique donnée.
- B. Prendre quatre flacons du solvant organique, lire attentivement et indiquez la classe de danger signalé par le/les pictogrammes signalé sur la bouteille.

TP 02 : La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie est une technique de séparation de composés, basée sur la différence d'affinité existant entre ces composés, la phase mobile, qui entraîne les composés, et la phase stationnaire.

La séparation des composés d'un mélange est due aux différences de solubilité. La phase stationnaire est retenue sur un support solide (papier (contenant un solvant polaire = eau) ou gel). Les composés plus solubles dans la phase aqueuse se déplacent lentement. Ceux qui sont soluble dans la phase organique migrent relativement plus vite.

La séparation des substances peut être aussi exprimée par l'indice **Rf** (rapport frontal) correspondant ($R_f = \text{distance parcourue par une substance divisée par la distance parcourue par l'éluant}$).

1. Principe

Séparer les différents pigments présents dans un composé chimique.

2. Matériel

- un bêcher ou une cuve à chromatographie
- une pince de bureau
- une pipette pasteur
- Plaque de CCM ou une bande de papier filtre (chromatographie sur papier)
- un séchoir

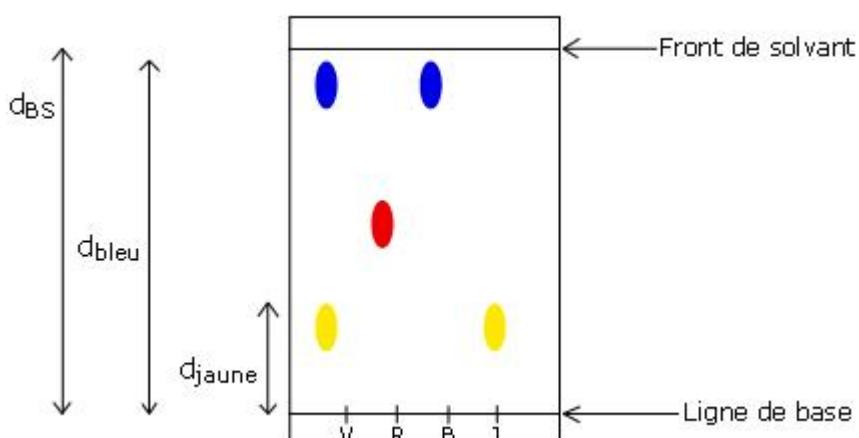
3. Réactifs

- Solvant : eau salée

- plusieurs colorants différents

4. Manipulation

- Verser environ 1 cm d'eau salée au fond du bêcher
- Tracer une ligne de dépôt
- Déposer sur la bande de papier filtre une tache avec un colorant à 2 cm du bord bas
- renouveler l'opération avec un autre colorant différent à environ 1cm de la première tâche et ainsi de suite
- tremper la feuille dans le bêcher en veillant à ce que les tâches ne trempent pas dans l'eau salée
- laisser migrer



Exemple 2: séparation d'un mélange d'acides aminés. Dans une phase mobile constituée par un mélange de n-butanol-acide acétique-eau (3:3:1), les acides aminés peuvent être séparés dans l'ordre croissant de leur R_f . Par exemple : l'ordre: CYS, ARG, SER, GLU, ALA, TYR, MET et LEU. La révélation des des acides aminés sur papier est effectuée par pulvérisation de la ninhydrine sur le papier séché (jaune orangé).

TP N° 3 : Chromatographie sur colonne d'un sirop de menthe

Introduction :

La chromatographie sur colonne est une technique de séparation préparative a pour but de **purifier et récupérer** un ou plusieurs types de molécules. Selon la nature de la phase fixe et/ou la phase mobile, on distingue plusieurs types de chromatographies sur colonne reposant sur différents principes :

- ✓ **La chromatographie sur colonne gel de silice** : où la séparation est basée sur la différence de polarité des particules.
- ✓ **La chromatographie par filtration sur gel polyacrylamide** : consistant en la séparation des particules selon leur poids moléculaire.
- ✓ **La chromatographie échangeuse d'ions** : les particules chargées seront séparées suivant leur **charge électrique**.
- ✓ **HPLC...**

But :

Etre capable de séparer les colorants alimentaires présents dans un sirop de menthe par la technique de chromatographie sur colonne

Principe :

La chromatographie sur colonne utilise une phase stationnaire (Gel de silice) introduite dans une colonne de verre. C'est une technique très largement utilisée pour séparer et purifier les différents constituants d'un mélange. Elle repose sur le même principe que la CCM : Les particules à séparer sont entraînées par une phase mobile (solvant ou éluant) le long de la phase stationnaire (gel de silice) suivant leur polarité.

Matériel et réactifs :

- | | | | |
|----------------------------|---------------------------|------------|------------------|
| -Gel de silice (poudre) | -Colonne en verre | -Béchers | -Pipette pasteur |
| -Eau distillée et eau salé | -Ethanol | -Entonnoir | -Sable et coton |
| -Sirop de menthe | -Support et tubes à essai | | |

Mode opératoire

Séparation des colorants par chromatographie sur colonne

1- Préparation de la colonne

La réalisation d'une colonne impose de respecter certaines règles qui permettront une séparation efficace.

On fixe tout d'abord la colonne (la burette) verticalement sur son support puis on place au fond d'elle un morceau de coton que l'on recouvert d'éluant, afin d'éliminer l'air emprisonné dans le coton. Ensuite, On rajoute un peu de sable au dessus du coton pour rendre la surface du gel plane. Le coton à pour rôle d'empêcher la phase stationnaire de s'échapper de la colonne tout en permettant l'écoulement de la phase mobile avec les colorants alimentaires bien entendu.

Enfin, on remplit la colonne avec de la phase stationnaire (30 g de silice par 1g de mélange à séparer) en réalisant une suspension de silice dans le premier éluant qui est l'eau salée. Le gel ainsi formé est introduit dans la colonne grâce à l'entonnoir. On rince avec l'éluant et on le laisse s'écouler tout en tapotant pendant la sédimentation des particules du gel.

Il est très important de s'assurer régulièrement de ne pas assécher la phase stationnaire, en vérifiant qu'il reste toujours de l'éluant (eau) au dessus du gel.

2- Dépôt

On amène le niveau d'éluant au niveau de la surface plane du gel puis on dépose délicatement, sans toucher les parois de la colonne, quelques gouttes du sirop de menthe par la pipette pasteur afin de ne pas déformer la surface plane du gel.

N'oublier pas de mettre un tube à essai sous la colonne afin de récupérer le premier colorant.

3- Elution

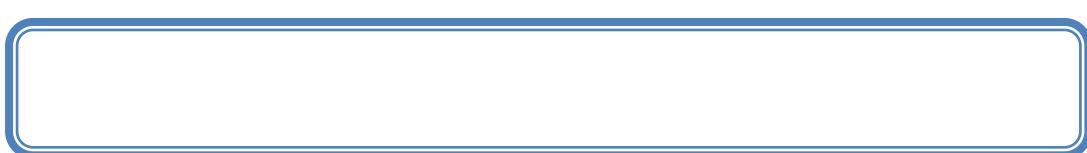
On rajoute quelques millilitres de l'eau (premier éluant) et on ouvre le robinet de la colonne. Les premiers millilitres doivent toujours être ajoutés avec précaution à la pipette pasteur afin de ne pas déformer la surface de silice. Ensuite, on peut ajouter l'éluant plus rapidement en le versant directement dans la colonne.

Le premier éluant, l'eau, permet l'élution d'un colorant jaune (tartazine) alors que le colorant bleu (bleu de pantenté V) reste fortement retenu par la phase stationnaire.

Après avoir récupérer le colorant jaune, on change d'éluant pour récupérer le colorant bleu.

A ce moment, on utilise l'éthanol. Le colorant jaune a peu d'affinité pour la silice par rapport à l'éluant (eau) donc il est entraîné très facilement. Par contre, le colorant bleu développe plus d'interactions avec la phase stationnaire et l'eau n'est alors pas un éluant capable de l'entraîner contrairement à l'éthanol. Enfin, on récupère le deuxième colorant dans un autre tube à essai.

Chargé de TP : Dr. Mosbah.C



TP 04 : Extraction et séparation

1. Extraction des composés phénoliques totaux

Cette étape qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétal, est primordiale car elle déterminera la quantité et la nature des substances extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes

1.1.Extraction solide-liquide (ESL)

L'extraction des polyphénoles est effectuée par macération à partir de la matière sèche finement broyée dans le méthanol 80% (v/v), le volume de solvant doit d'être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Après macération de 30 mn avec agitation, le macérât est filtré sur Büchner sous pression réduite puis soumis à une évaporation à basse pression à 50°C par un Rota Vapor.

1.2.Fractionnement de l'extrait hydrométhanolique par Extraction liquide-liquide (ELL)

Dans le but de partager les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques, un fractionnement liquide-liquide est réalisé entre deux phases non miscibles. l'extrait hydrométhanolique est débarrassé d'abords des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole (v/v) pour donner une phase aqueuse. Afin de séparer les flavonoïdes en fractions aglycones, monoglycosides et di et triglycosides, la phase aqueuse est mélangée avec chloroforme (v/ v) pour obtenir une phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés. La phase aqueuse restante subit à son tour trois extractions avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certains flavonoïdes aglycones mais surtout les monoglycosides. Les deux fractions récoltées acétate d'éthyle (ACT) et Chloroformique (CHL), sont concentrées par évaporation à basse pression à 45°C puis lyophilisées pendant. La lyophilisation permet d'obtenir un produit facilement soluble dans l'eau et qui, après addition d'eau, présente les mêmes caractéristiques que le produit d'origine. Chaque lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction, exprimé en gramme de lyophilisat par 100 g de matière sèche. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = M \times 100/M'$$

R: Rendement de chaque phase

M: masse de l'extrait de chaque phase

M': masse de la matière sèche de la plante

TP 05 : Dosage de l'acidité totale d'un vinaigre 8°

1. Introduction :

L'acidité du vinaigre est liée à l'acide acétique CH_3COOH (acide éthanoïque), cet acide détermine le degré d'acidité du vinaigre (Degré d'acidité = pourcentage massique).

Pour un vinaigre, le degré X° est donné par l'expression
(C_m : concentration massique)

$$X^\circ = C_m / 10$$

2. But :

L'objectif général du dosage est de déterminer la concentration d'une solution que l'on ne connaît pas. Dans ce TP notre objectif, c'est de contrôler cette norme, si le fabricant a respecté le degré du produit, et s'il a mis effectivement 8% d'acidité dans la bouteille de vinaigre ou non.

3. Principe :

Dosage de l'acide faible CH_3COOH par une base forte NaOH qui donne un sel basique ($\text{pH} > 7$). L'emploi de l'indicateur coloré dépend de la nature du sel (Tableau). Dans ce cas on utilise le Phénolphtaléine comme indicateur coloré.

4. Matériel et réactifs :

- | | | | |
|-----------------|-----------------------------|-------------------|------------------|
| - Vinaigre 8° | - NaOH (0.1 mol/L) | - Phénolphtaléine | - Fiole de jaugé |
| - Eau distillée | - Burette graduée | - Entonnoir | - Bécher |
| | | - Agitateur | |

5. Mode opératoire :

- ✓ Diluer l'acide acétique à 10% (prélever 10 ml d'acétique par pipette de jaugé et la placer dans une fiole de jaugé de 100ml, puis compléter par l'eau).
- ✓ Prélever 10 ml du vinaigre dilué, et le verser dans le bécher (solution titré).
- ✓ Mettre 10 gouttes de thymolphtaléine
- ✓ Placer la soude $\text{NaOH} = 0.1\text{mol/L}$ (solution titrante) dans la burette (rincer la burette et vérifier que le robinet est fermé), puis ajuster le zéro.
- ✓ Mettre l'agitateur en marche
- ✓ Ouvrir le robinet dans un premier temps rapidement, et dans un deuxième temps goutte à goutte jusqu'à avoir le changement de couleur (couleur rose persistante), là on ferme le robinet.

Questions :

- 1) Dessiner le montage du dosage expérimental présenté ?
- 2) Quel est le volume équivalent V_{eq} ?
- 3) Écrire la demi-équation de cette réaction ?

- 4) Déduire la concentration de l'acide acétique $C_{\text{acétique}}$, via la concentration du vinaigre?
- 5) Déduire la concentration massique de l'a. acétique ?
- 6) Vérifier l'indication de 8% donné sur l'étiquette de la bouteille (Le pourcentage correspond à la masse de l'acide acétique pure par rapport à la masse d'un litre de vinaigre), et comme indication 1L de vinaigre pèse 1023g.

$$C=12 \text{ g/mol}, \quad H=1 \text{ g/mol}, \quad O=16 \text{ g/mol}, \quad Na=23 \text{ g/mol}.$$

	3,1		4,4	
Hélianthine	rouge	Zone de Virage orange		Jaune
	6,0		7,6	
B.B.T	jaune	Zone de Virage	vert	Bleu
	8,2		10	
Phénolphtaléine	Incolore	Zone de virage Rose très pâle		Rose fuchsia

Réponse :

- $V_{\text{eq}} = 13.6 \text{ mL} = 0.0136 \text{ L}$
- $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{OH}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$
- A l'équivalence :
- $n \text{ CH}_3\text{COOH}/1 = n \text{ OH}^-/1$
 $n = C \times V \rightarrow C_A V_A = C_B V_{\text{eq}} \rightarrow C_A = C_B V_{\text{eq}} / V_A = 0.1 \times 0.0136 / 0.010 C_{\text{dilué}} = 0.136 \text{ mol/L}.$
 $C_{\text{acétique}} = C_{\text{dilué}} \times 10 = 1.36 \text{ mol/L.}$
- Pour passer de la concentration molaire C à la concentration massique C_m , on doit calculer la masse molaire M :
 $M_{\text{acétique}} = 2(12) + 4(1) + 2(16) = 60 \text{ g/mol.}$
 $C_m = C_A \cdot M = 1.36 \times 60 \rightarrow C_m = 81.6 \text{ g/L}$ (càd que dans 1L de vinaigre on a 81.6 g de l'acide acétique pure).
- $1023 \text{ g vinaigre} \rightarrow 100 \%$
 $81.6 \text{ g pure} \rightarrow X$
 $X = 7.98 \text{ %}.$

Sur la bouteille on trouve 8%, et nos calculs ont donné 7.98%..... Avec l'incertitude de lecture et les erreurs de mesures, il y aura toujours **un pourcentage d'écart**, et donc on est relativement proche. Dans ce cas, on peut dire que le fabricant a bien respecté la norme.

Sources d'erreurs possibles :

- Au cours de la fabrication du produit il peut exister un écart entre la quantité prévue de acide acétique et celle qui est réellement mise dans le vinaigre.
- Il y a des risques de perte par projection pendant agitation
- Il existe des erreurs inhérentes à toute procédure de dosage : prélèvement des volumes, préparation de la fiole jaugée, stabilisation du pH, ...

TP 06 : Dosage de l'acide ascorbique contenu dans un comprimé de Vitamine C

4. Introduction :

La Vitamine C (ou acide ascorbique) est une substance essentielle pour le métabolisme. Elle joue un rôle anti-infectieux, antioxydant et antihémorragique. -Elle est commercialisée sous forme de comprimés qui renferment le principe actif qui est l'acide ascorbique en plus d'un excipient qui est généralement l'amidon. -L'acide ascorbique est un acide faible de formule brute $C_6H_8O_6$, avec une masse molaire =176 g/mol.



5. But :

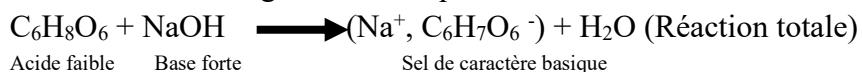
Déterminer la masse et le pourcentage d'acide ascorbique contenu dans un comprimé commercial de « Vitamine C 500 mg »

6. Principe :

Afin de déterminer la masse d'acide ascorbique, nous allons procéder par la méthode de titrage acido-basique avec un suivi colorimétrique, le principe de la manipulation consiste à:

- 1) Préparer une solution d'acide ascorbique de volume connu et de concentration inconnue.
 - 2) Doser la solution préparée par une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (soude) de concentration connue (0.01M)

La réaction du dosage acido-basique est:



- ❖ L'acide ascorbique est un diacide mais seule la première acidité est neutralisée dans ce dosage.
 - ❖ A l'équivalence (fin de la réaction), toutes les espèces acides $C_6H_8O_6$ sont neutralisées par les ions OH⁻ de la base et il y a formation d'un sel basique qui est l'ascorbate de sodium (Na^+ , $C_6H_7O_6^-$).
 - ❖ Le suivi colorimétrique de la réaction de dosage signifie l'utilisation d'un indicateur coloré afin de repérer le point d'équivalence par changement de couleur.

4. Matériel et produits:

Balance, Bécher , Burette, Erlenmeyer, Pipette, Pissette d'eau distillée , Vitamine C, NaOH, Phénol phtaléine.

5. Mode opératoire :

1. Préparation de la solution d'acide ascorbique

- Peser le comprimé de vitamine C.
- Dissoudre le comprimé dans environ 50 ml d'eau distillée chaude.
- Verser la solution dans une fiole de 100 ml puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- Diluer 10 fois la solution obtenue.

2. Titrage de la solution d'acide ascorbique par la solution de NaOH

- Remplir la burette avec la solution de soude NaOH.
- Prélever 15 ml de la solution diluée d'acide ascorbique et les verser dans un erlenmeyer.
- Ajouter deux ou sept gouttes d'indicateur coloré.
- Commencer le titrage en versant la solution de NaOH goutte à goutte dans la solution d'acide ascorbique jusqu'à changement de couleur.
- Noter le volume de NaOH versé à l'équivalence.
- Répéter l'expérience 3 fois

Travail à faire :

- 7) Dessiner le montage du dosage expérimental présenté ?
- 8) Quel est le volume équivalent V_{eq} ?
- 9) Déduire la concentration de l'acide ascorbique?
- 10) Déterminer le pourcentage d'acide ascorbique contenu dans le comprimé du Vitamine C?
- 11) Calculer l'erreur relative entre la masse expérimentale et théorique de l'acide ascorbique?

	3,1	4,4	
Hélianthine	rouge	Zone de Virage orange	Jaune
	6,0	7,6	
B.B.T	jaune	Zone de Virage vert	Bleu
	8,2	10	
Phénolphtaléine	Incolore	Zone de virage Rose très pâle	
		Rose fuchsia	

□ Exploitation des résultats

Au point d'équivalence, on a:

$$n_{\text{acide ascorbique}} = n_{\text{base}}$$

(C₆H₈O₆) (NaOH)

$$\rightarrow C'_A \cdot V_A = C_B \cdot V_{B(\text{éq})} \rightarrow C'_A = C_B \cdot V_{B(\text{éq})} / V_A$$

$$\rightarrow C_A = 10^* C'_A$$

Nombre de mole d'acide ascorbique (n_A):

$$n_A = C_A * V_{\text{sol mère}}$$

Masse d'acide ascorbique (m_A):

$$m_{A(\text{exp})} = n_A * M_{\text{molaire}}$$

Pourcentage d'acide ascorbique contenu dans le comprimé du Vitamine C:

$$\% = (m_A / m_{\text{comprimé}}) * 100$$

Erreur relative entre la masse expérimentale et théorique de l'acide ascorbique:

$$\text{Erreur relative} = \left| \frac{(m_{\text{théo}} - m_{A(\text{exp})})}{m_{\text{théo}}} \right| * 100$$