

DEUXIEME PARTIE

—

**CONTRIBUTION
PERSONNELLE**

CHAPITRE I

METHODES QUALITATIVE ET QUANTITATIVE ETUDIEES

Il s'agit, comme nous l'avons dit précédemment, de la chromatographie des sels d'éthylamine d'acides gras.

Ces sels ont été employés par Hiscox et Berridge [44] qui les séparent très bien à l'aide d'une phase mobile constituée de butanol et d'eau (en présence d'éthylamine) puisque les R_f obtenus sont les suivants :

Acides	R_f
Acétique	0,20
Propionique	0,31
Butyrique	0,44
Valérianique	0,56
Caproïque	0,77
Enanthylique	—
Caprilique	0,91

Nous avons adopté le même solvant : butanol saturé d'eau (environ 100 ml de butanol et 22 ml d'eau distillée) et la technique de chromatographie ascendante qui simplifie l'appareillage.

En résumé, l'analyse d'une solution aqueuse des sels d'éthylamine d'acides gras volatils comporte les opérations suivantes :

Des gouttes de solution à analyser sont déposées près d'un bord d'une feuille de papier spécial. La feuille de papier est placée verticalement dans une atmosphère saturée d'eau de butanol et contenant des vapeurs d'éthylamine, et telle que le bord inférieur (près duquel on a déposé les gouttes de solution) plonge dans le solvant. Celui-ci chemine vers le bord supérieur en entraînant les sels avec une vitesse d'autant plus grande que leur solubilité y est plus grande. La feuille de papier après un séchage qui élimine solvant et éthylamine, subit deux traitements différents suivant que l'on veut effectuer une caractérisation et une simple estimation ou un dosage.

Pour une caractérisation, les taches de sels sont révélées par pulvérisation d'une solution d'un indicateur de pH tel que le vert de bromocrésol et fixées par plastification si l'on veut conserver le chromatogramme.

Pour un dosage, les taches (non révélées) sont découpées et mises dans 10 centimètres cubes d'eau ; les sels s'y dissolvent. La variation de conductibilité créée dans l'eau par la présence de ces sels est mesurée au pont de Kolhrausch. Comme les conductibilités sont proportionnelles aux concentrations, on peut, en utilisant un graphique construit spécialement, en déduire la teneur en acide de la solution initiale.

I. — METHODE QUALITATIVE CLASSIQUE DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Examinons en détail les divers stades de la méthode classique :

Le papier :

Le papier employé, du Whatman n° 1 « spécial pour chromatographie », est coupé en feuilles de longueur et de largeur nécessaires, puis reçoit les gouttes de solution à analyser. Les spots sont placés de 2 à 5 cm du bord plongeant (par environ 0,5 cm) dans le butanol saturé d'eau. Puisque la surface de la tache augmente avec le temps de développement et la quantité d'acide, chaque spot est séparé du suivant par 2 à 4 cm selon la quantité de matière à analyser et la durée de la séparation. Pour des séparations de faibles quantités (inférieures à une prise de l'ordre de $1 \cdot 10^{-6}$ molécule-gramme), un papier de 25 cm de haut suffit ; pour de très bonnes séparations de grosses quantités (supérieures à environ $1 \cdot 10^{-6}$ molécule-gramme), on utilise des papiers de 30 à 40 cm de hauteur.

Les spots :

Les spots sont formés sur ces papiers à l'aide d'un tube de verre étiré en capillaire et contenant une plus ou moins grande quantité de solution aqueuse des sels d'éthylamine mesurée approximativement pour cette analyse qualitative. Lorsque le papier a reçu tous les spots, les bords latéraux sont réunis par deux trombones ou deux aiguilles de verre, de façon à former un cylindre qui va reposer sur sa base circulaire dans le fond de la cuve.

La cuve :

En chromatographie ascendante, nous n'employons que des cuves ($20 \times 25 \times 48$ cm³) ou des bocal de verre fermés hermétiquement, dans le fond desquels se trouve le solvant contenu dans un couvercle d'une boîte de Pétri ou dans une cuve à photographie (Figure 5). Dans le fond de la cuve elle-même se trouve de l'eau saturée de butanol additionnée de 0,3 à 0,5 cm³ de solution d'éthylamine à 33 % pour 50 cm³ ; ce qui donne à l'intérieur de la cuve une atmosphère saturée d'eau et de butanol et contenant des vapeurs d'éthylamine évitant la dissociation des sels d'acide ~~se eau saturée de butanol, pour ne laisser subsister que le butanol saturé d'eau et des gras se trouvant sur le papier.~~

A un certain moment, nous avons même supprimé dans une de nos cuves la phase eau-saturée de butanol, pour ne laisser subsister que le butanol saturé d'eau et

additionné alors d'éthylamine. Cette phase est mise directement dans le fond de la cuve et la boîte de Pétri supprimée. Au sortir de la cuve, le chromatogramme doit, en raison de sa basicité un peu plus grande que dans le système à deux liquides, être séché un peu plus longtemps ou révélé avec une pulvérisation un peu plus acide. Les séparations des différents acides sont aussi bonnes que précédemment et l'on possède l'avantage d'avoir le fond de la cuve entièrement libre pour y mettre de nombreux papiers.

L'ascension du liquide dure de 12 à 22 heures.

Le séchage et la révélation :

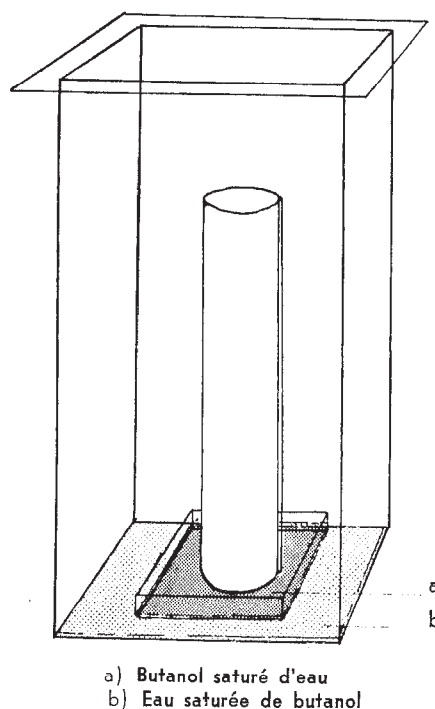
Le papier est ensuite sorti de la cuve et séché à l'air libre pendant une heure environ. La révélation des taches représentant les différents sels d'acides gras se fait par une fine pulvérisation d'une solution de vert de bromocrésol de 0,3 à 0,5 % dans éthanol-butanol v/v et additionnée de quelques milligrammes d'acide citrique ou lactique afin d'avoir un bon contraste de couleur entre les taches et le fond. On obtient alors de belles taches bleues sur fond jaune. L'identification des acides se fait par la mesure du Rf ; mais comme ce Rf varie en particulier avec les quantités d'acides employées, il est préférable de pratiquer cette identification en faisant courir sur le même papier un mélange connu de sels d'acides gras purs. On évite ainsi des erreurs et la mesure du Rf.

Les différents Rf que nous avons trouvés lors de nos travaux sont donnés par le tableau suivant :

Acide	Rf	Rf de Hiscox et Berridge [44]
Acétique	0,20	0,20
Propionique	0,30	0,31
Butyrique	0,43	0,44
Valérianique	0,56	0,56
Caproïque	0,66	0,77
Céanthylique	0,70	—

Nous avons mesuré des Rf sensiblement égaux en remplaçant l'éthylamine par une autre base organique : la morphine et en utilisant la même technique et le même

FIGURE 5



solvant. L'atmosphère de la cuve contient alors des vapeurs de morpholine, mais nous avons aussi essayé, avec succès, la séparation des sels de morpholine dans une cuve contenant uniquement des vapeurs d'éthylamine (dans une cuve préparée pour la séparation des sels d'éthylamine).

La plastification :

Les chromatogrammes ainsi obtenus possèdent un grave défaut représenté par leur mauvaise conservation : en quelques heures, tout le papier prend une couleur verdâtre et les taches ne se distinguent plus. Nous avons constaté que cette disparition pouvait être retardée de quelques jours si l'on conservait ce papier comprimé entre deux plaques de verre. Cette méthode de conservation étant incommode et assez limitée dans le temps, nous avons été amenés à rechercher une technique produisant des chromatogrammes exempts de ces défauts. La plastification donne de bons résultats.

Après divers essais, nous avons adopté le formvar (matière servant dans les laboratoires de microscopie électronique à obtenir un film mince et transparent où est déposée la préparation à examiner) dissous dans différents solvants tel que le dioxanne, le chloroforme ou un mélange trichloréthylène-chloroforme (2 v/1 v). La solution se fait environ à 10 grammes de formvar pour 100 cm³ de solvant et une goutte d'acide lactique (donnant à cette solution l'acidité nécessaire à la conservation du fond bien jaune du chromatogramme).

Le chromatogramme est enduit de cette solution de la façon suivante : une certaine quantité est répandue sur une plaque de verre en une surface égale à celle du papier à plastifier et sur une épaisseur d'environ 1 millimètre. Le chromatogramme qui vient de subir la pulvérisation d'indicateur de pH est alors déposé sur cette couche, puis recouvert d'une seconde couche de solution que l'on étale uniformément avec un pinceau très large par exemple. On laisse ensuite sécher le tout pendant une demi-journée environ à la température ordinaire. Le papier est alors détaché de la plaque de verre ; cette opération se fait aisément si la couche de solution déposée sur le verre était assez épaisse pour empêcher le papier de coller au verre. On peut, pour éviter cet ennui, déposer auparavant sur le verre un film de formvar bien sec, fait comme précédemment par évaporation de la solution chloroformique. On peut également employer une solution plus concentrée en formvar, mais on risque fort de voir apparaître lors du séchage de nombreuses bulles dans la matière plastique.

Les chromatogrammes ainsi obtenus présentent des taches bien visibles avec le même contraste de couleur que lors de la pulvérisation de la solution de vert de bromocrésol et ce pendant plusieurs mois (nous ne pouvons encore juger sur des années puisque nos premiers essais remontent à six mois). Grâce à cette plastification intime de tout le papier, il est permis de comparer différentes analyses, faites à des intervalles de temps assez éloignés, de façon bien plus avantageuse qu'avec des chromatogrammes, ou sur un fond uni et verdâtre, il ne reste que des surfaces définies par le trait de crayon dont on les avait entourées immédiatement après leur révélation.

II. — METHODE DE DOSAGE PAR CONDUCTIMETRIE

C'est sur cette méthode de séparation des sels d'éthylamine que nous avons établi notre technique de dosage par mesures de conductivité, basée sur le principe suivant :

Considérons un électrolyte qui, mis en solution dans l'eau, libère plusieurs ions et l'ion j en particulier qui possède les caractéristiques suivantes :

q_j	charge électrique (de l'ion-gramme)
v_j	mobilité à une température déterminée (vitesse dans le champ électrique unité)
c_j	concentration (en ion-gramme par unité de volume)

On établit aisément la contribution de cet ion (σ_j) à la conductibilité de la solution :

$$\sigma_j = c_j \cdot q_j \cdot v_j$$

Pour l'ensemble des ions de l'électrolyte, la conductibilité résultante σ est simplement la somme :

$$\sigma = \sum \sigma_j$$

ou

$$\sigma = \sum c_j \cdot q_j \cdot v_j$$

Cette formule n'est valable que pour des concentrations assez faibles qui sont justement réalisées par la dissolution dans 10 cm³ d'eau des sels contenus dans une tache de chromatogramme ; elles sont de l'ordre de 10⁻⁴ molécule-gramme par litre. L'intérêt de cette formule se résume dans le cas de nos mesures en cette relation :

$$\sigma = k_j \cdot c.$$

qui exprime que la conductivité due à l'électrolyte est simplement proportionnelle à sa concentration.

Mais il faut remarquer qu'il existe dans la solution d'autres ions que ceux formés par les sels d'éthylamine :

- ceux qui subsistent dans l'eau, même après une double distillation,
- ceux qu'apporte le papier et dont la totalité ne peut être éliminée par plusieurs lavages successifs à l'eau bi-distillée,
- ceux qui se sont rajoutés aux sels d'éthylamine malgré les précautions prises au cours des différentes manipulations (en particulier l'éthylamine provenant de l'atmosphère de la cuve).

Tous ces ions donnent à l'eau une conductivité σ_i qui vient s'ajouter à celle des sels d'éthylamine, pour former la conductivité totale σ_t de la solution

$$\sigma_t = \sigma + \sigma_i$$

Si l'on veut connaître σ il faut calculer σ_t et σ_i . Nous les obtenons à partir de

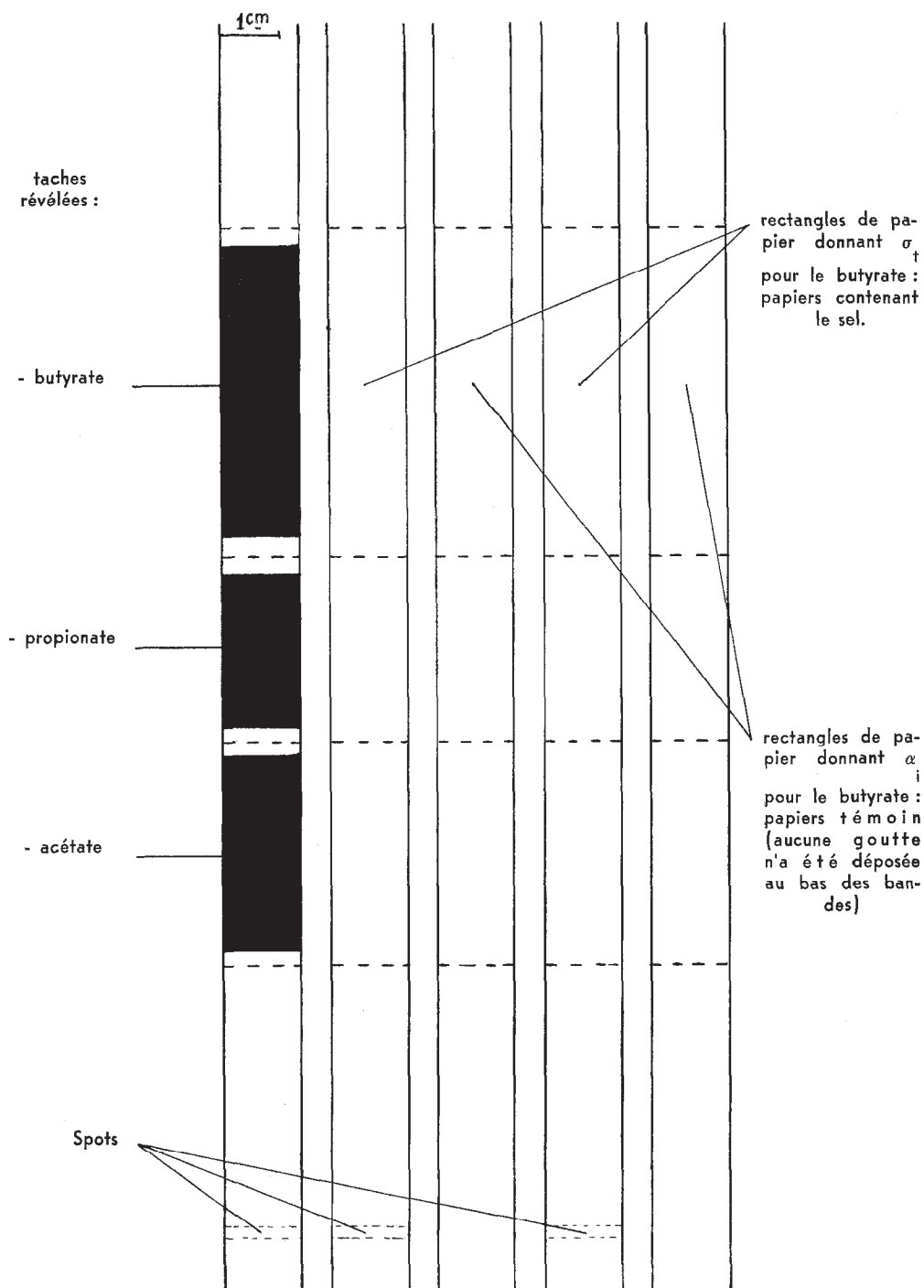


FIGURE 6

Découpage du papier permettant d'obtenir σ_t et la valeur correspondante α_i

la mesure des résistivités de deux solutions obtenues de façon identique à cela près que les sels d'acides gras ne sont présents que dans l'une.

Dans 10 cm³ d'eau bi-distillée nous plongeons un rectangle de papier contenant le sel d'éthylamine d'un certain acide, et dans 10 cm³ d'eau bi-distillée provenant du même flacon nous faisons plonger un rectangle de papier de mêmes dimensions que le précédent, découpé sur la même feuille et à la même hauteur, mais sur une trajectoire libre de tout sel d'acide. (Figure 6)

L'appareil utilisé est un pont de Kohlrausch perfectionné, équipé d'un trèfle à rayons cathodiques pour appréciation de l'équilibre. Il fournit avec une précision de 1 à 5 % la résistance (en ohms) de l'électrolyte prise entre ses deux électrodes, soit

R_t pour la solution avec le sel d'éthylamine

et

R_i pour la solution avec les impuretés.

Les résistivités correspondantes sont proportionnelles :

$$r_t = K_2 \cdot R_t$$

$$r_i = K_2 \cdot R_i$$

la constante K_2 étant caractéristique de la paire d'électrodes. Les conductivités étant les inverses des résistivités on a :

$$\sigma_t = \frac{1}{r_t} = \frac{1}{K_2} \cdot \frac{1}{R_t}$$

$$\sigma_i = \frac{1}{r_i} = \frac{1}{K_2} \cdot \frac{1}{R_i}$$

La conductivité due au sel d'éthylamine seul est :

$$\sigma = \sigma_t - \sigma_i = \frac{1}{K_2} \cdot \left(\frac{1}{R_t} - \frac{1}{R_i} \right)$$

Comme la concentration est proportionnelle à σ ,

$$c = \frac{1}{K_1} \cdot \sigma,$$

on a finalement la relation :

$$c = \frac{1}{K_1 K_2} \cdot \left(\frac{1}{R_t} - \frac{1}{R_i} \right)$$

on en changeant la constante :

$$c = K \cdot \left(\frac{1}{R_t} - \frac{1}{R_i} \right)$$

Cette constante K qui permet de calculer la concentration à partir de deux lectures R_t et R_i faites sur le pont de mesure est déterminée graphiquement à partir

de solutions témoins, elle est différente pour chaque acide et pour chaque température.

Un calcul classique montre que :

$$\begin{aligned} \text{Erreur relative sur la concentration} & \quad \frac{\Delta c}{c} \\ \text{est une fonction de l'erreur relative sur la mesure de } R_t & \quad \frac{\Delta R_t}{R_t} \\ \text{et de l'erreur relative sur la mesure de } R_i & \quad \frac{\Delta R_i}{R_i} \end{aligned}$$

suivant la formule :

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{\frac{\Delta R_t}{R_t} \cdot R_i + \frac{\Delta R_i}{R_i} \cdot R_t}{R_i - R_t}$$

L'appareil de mesure Philips donne une précision de 1 à 5 % suivant la valeur de R, mais pour simplifier les calculs qui suivent (et sans risque de les fausser), on peut admettre que :

$$\frac{\Delta R_t}{R_t} = \frac{\Delta R_i}{R_i} = \frac{\Delta R}{R} \leq 5 \%$$

et la formule devient :

$$\frac{\Delta c}{c} \leq \frac{\Delta R}{R} \cdot \frac{R_i + R_t}{R_i - R_t}$$

ou encore :

$$\frac{\Delta c}{c} \leq \frac{\Delta R}{R} \left(1 + \frac{2 R_t}{R_i - R_t} \right)$$

R_i et R_t étant toujours positifs et R_i étant toujours supérieur à R_t , le rapport $\frac{2 R_t}{R_i - R_t}$ est minimum et tend vers zéro quand R_i tend vers l'infini. Cela met clairement en évidence que la précision du résultat est d'autant plus grande que R_i est élevé et que la différence $R_i - R_t$ est grande. Comme R_t est limité vers les valeurs inférieures par la quantité de sels extraite du chromatogramme et le volume d'eau indispensable pour remplir la cuve contenant les électrodes du pont de mesure, il faut augmenter R_i en diminuant autant que possible la quantité d'impuretés : d'où la nécessité de l'eau bi-distillée, du lavage préalable du papier et des précautions de manipulation du chromatogramme.

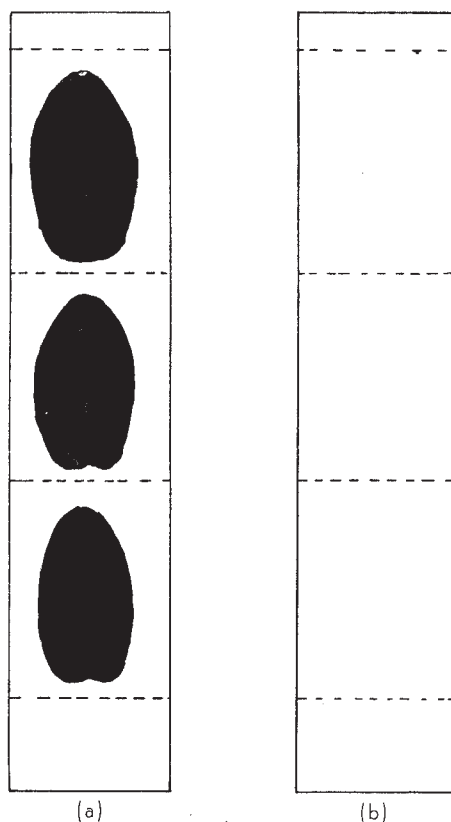


FIGURE 7

Découpage des taches sans disposition spéciale
 (a) Papier témoin donnant la position des taches.
 (b) Papier à découper.

Voici comment nous avons été amenés à modifier les divers stades de la méthode classique de chromatographie.

Le papier :

Le papier employé est du Whatman n° 1 « spécial pour chromatographie », lavé à l'eau distillée, puis bi-distillée, pour le débarrasser des sels qu'il contient. Ce lavage se fait dans une cuvette en polyéthylène (matière qui n'est pas susceptible de céder beaucoup d'ions à l'eau et au papier) et dure une demi-journée avec quatre ou cinq renouvellements de l'eau dont on contrôle chaque fois la résistivité. Le papier ainsi lavé est égoutté dans la cuvette même placée verticalement et plaqué sur le fond de celle-ci. Puis le papier est étendu à l'abri des poussières et séché soit à la température ordinaire, soit dans une étuve à 35-40° C. Malgré ces précautions, le papier contient toujours des traces de sels qui modifient la conductivité de la solution servant au dosage. Il convient donc de réduire au minimum la surface de papier à découper et par suite celle des taches. Si l'on ne prend aucune disposition spéciale, il faut, connaissant la position de la tache, découper le papier de manière à laisser une marge de quelques millimètres autour de celle-ci pour être sûr de ne pas couper les taches. (Figure 7)

Une amélioration sensible consiste en un découpage préalable du papier en bandes étroites, ce qui a pour effet de limiter l'expansion des taches dans le sens transversal à leur déplacement et de réduire la surface du papier à découper dans un rapport de 1/2 ou 1/3. (Figure 8)

La feuille de papier Whatman est découpée au rasoir en bandes de 1 à 1,4 centimètre de large séparées par des intervalles de 0,5 centimètre sur la plus grande partie de sa longueur. La coupure commence dans le bas de la feuille à environ 3 centimètres du bord et finit à une hauteur un peu supérieure à celle que doit atteindre la tache possédant le plus grand Rf. Les spots sont déposés 1 centimètre plus haut que le bord inférieur de la coupure et sont de forme circulaire ou allongée. De cette manière, les taches empruntent toute la largeur de la bande et après développement il ne reste à pratiquer qu'une coupure entre chaque tache. Ces taches étant plus étroites et par conséquent plus longues que précédemment, leur

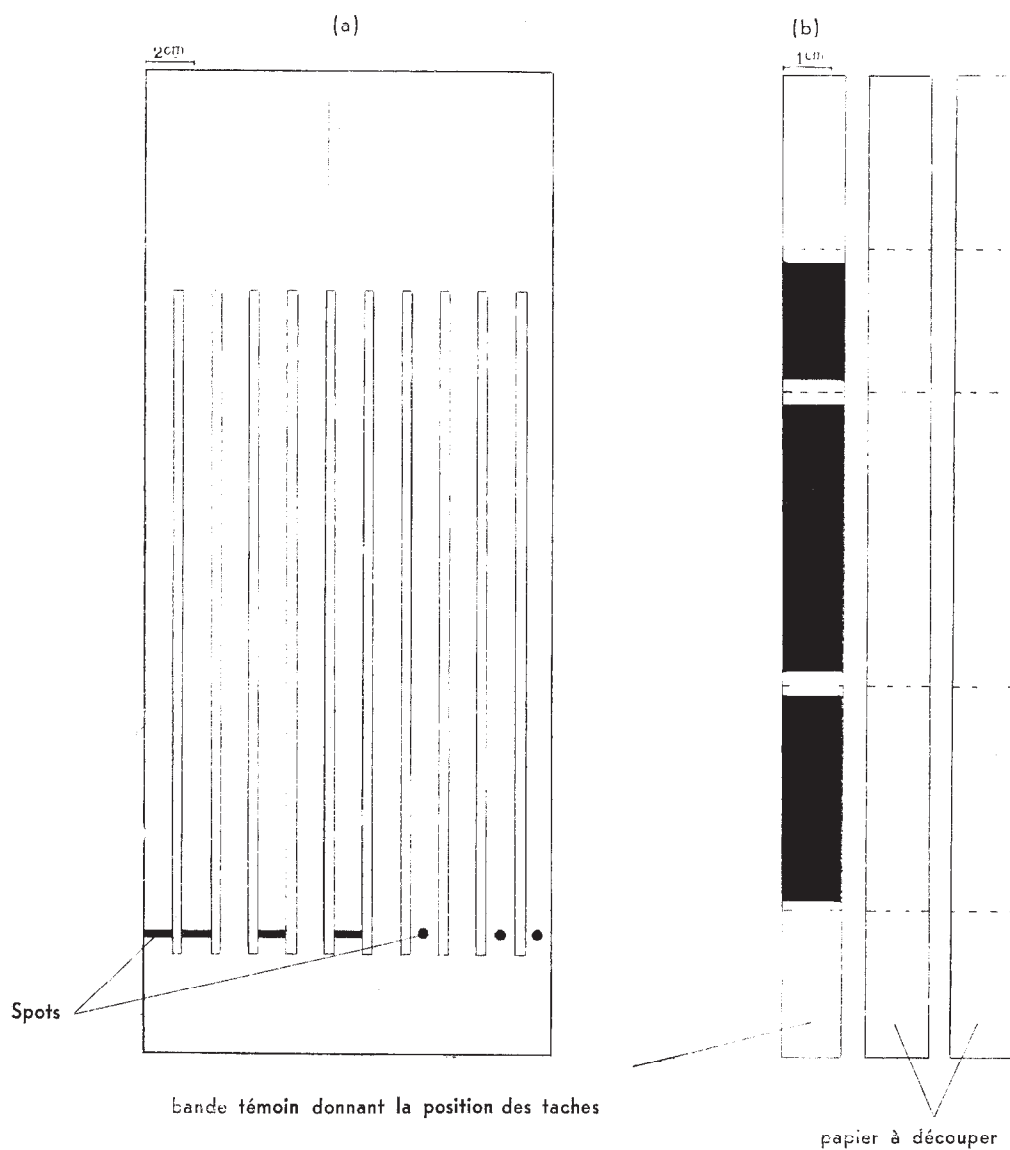


FIGURE 8

(a) découpage du papier en bandes

(b) découpage des taches obtenues

séparation demande à ce que les bandes soient parcourues par le butanol pendant un temps plus grand. Ceci est réalisé d'une part en augmentant la longueur du chromatogramme et d'autre part en laissant dans le haut de la feuille, le maximum de surface unie (sans coupure) qui, pour s'imbiher de butanol, crée dans les bandes un courant de solvant de durée plus importante que si la coupure allait jusqu'en haut de la feuille de papier.

Si la longueur de la feuille ainsi découpée est légèrement supérieure à celle utilisée habituellement, sa largeur peut être considérablement réduite ; par exemple, pour 10 spots il suffit d'une feuille de 18 centimètres au lieu de 25 centimètres. Le

même nombre d'analyses nécessite des feuilles d'encombrement moindre et une cuve plus réduite si on le désire.

Dépôt et séchage des spots :

La feuille ainsi découpée reçoit les différents liquides à analyser. Pour chacun d'eux, les spots sont faits en plusieurs exemplaires : par exemple 3 ou 4 afin de permettre 2 ou 3 dosages et une révélation au vert de bromocrésol qui indique les coordonnées des taches à découper. La pipette employée pour le dépôt des spots est dans notre laboratoire, constituée par la colonne d'un thermomètre cassé dont on a coupé les deux extrémités et effilé l'une d'elles. Les graduations de température servent alors de graduations de volume après avoir étalonné la colonne à l'aide d'une autre micropipette. On mesure ainsi de très petits volumes de liquide : notre pipette de 22 centimètres de long possède 260 divisions et contient dans cette partie graduée 0,004 cm³. Le remplissage de cette pipette se fait en créant une légère dépression à la partie supérieure et le dépôt du liquide par aspiration du papier lorsque celui-ci est mis en contact avec le bout effilé de la pipette.

Dans de nombreuses techniques chromatographiques on utilise lors de cette opération un système de séchage (notamment air chaud ou infra-rouge) dans le but d'obtenir une manipulation aussi courte que possible surtout si l'on doit déposer un grand nombre de gouttes sur le même spot. Dans le cas des sels d'éthylamine des acides gras volatils de telles méthodes sont à proscrire, étant donné la volatilité et la faiblesse des acides et de la base employés. Notre méthode conductimétrique nous a permis de préciser les conditions suivantes qui réduisent au minimum les pertes par dissociation et évaporation :

- a) Ne pas utiliser de courant d'air pour sécher les spots.
- b) Opérer en présence de vapeurs d'éthylamine, obtenues en déposant à environ 1 centimètre sous la feuille de papier Whatman une feuille de papier filtre imbibée de solution d'éthylamine.
- c) Employer des solutions de sels qui ont reçu si possible un excès d'éthylamine après la neutralisation.

La cuve :

Le papier ainsi préparé est placé dans la cuve de séparation. Mais comme il ne possède plus la rigidité nécessaire pour former un cylindre tenant debout de lui-même, on le suspend à l'aide d'épingles à un pied en V contenu dans la cuve, ou mieux à un système de deux baguettes de verre coincées à hauteur voulue entre les parois de la cuve. (Figure 9)

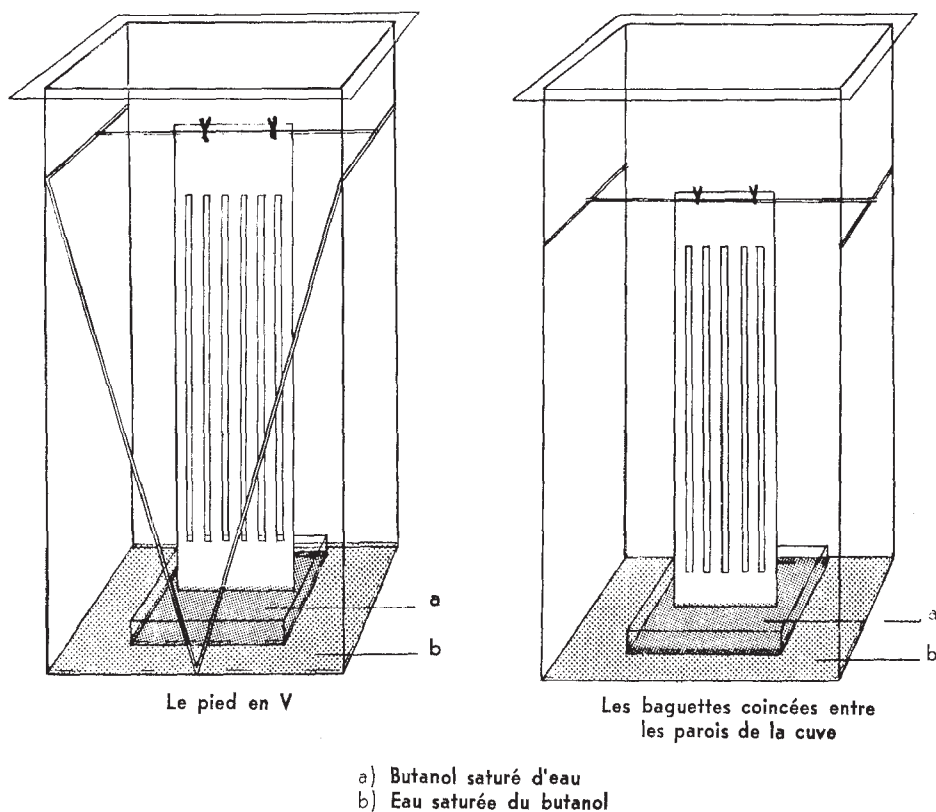
La cuve contient toujours deux liquides :

- Butanol saturé d'eau comme solvant.
- Eau saturée de butanol + environ 3 % de solution d'éthylamine à 33 % pour créer l'atmosphère humide et éviter la dissociation.

Le séchage :

Après un temps qui varie entre 18 et 22 heures, le solvant a atteint le haut du chromatogramme et le développement est terminé. Le papier est sorti de la cuve, égoutté et séché. Pendant ces opérations, il faut éviter d'une part de fixer des impuretés sur le papier et d'autre part les pertes par dissociation-évaporation des sels.

FIGURE 9



Avec un séchage à la température ordinaire et dans le laboratoire avec une atmosphère d'air calme, on obtient dans le dosage des résultats inconstants et toujours en dessous des valeurs que l'on devrait théoriquement obtenir comme le montre le graphique de la figure 10. Ce graphique a été tracé lors de la mise au point de la méthode, en opérant avec des solutions de titre connu et constituées d'acides gras purs.

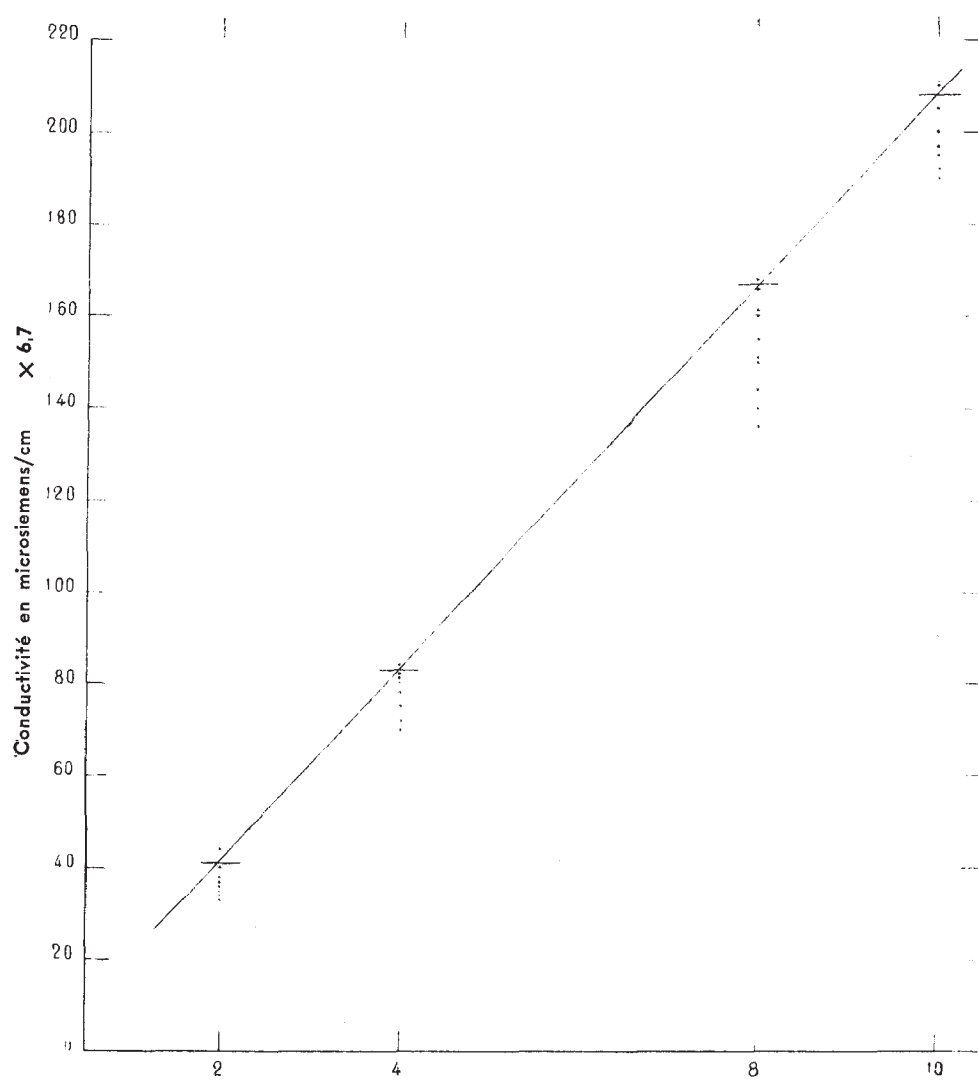
Après avoir pris les précautions déjà vues pour éviter la dissociation lors du dépôt des liquides sur le papier, nous avons recherché dans quelles conditions on pouvait éviter les pertes lors du séchage : le papier est transféré directement de la cuve dans une cage en verre de $36 \times 46 \times 66$ cm³ contenant une atmosphère d'éthylamine (0,5 cm³ de solution à 33 % répandu dans le fond de cette cage) ce qui évite la dissociation des sels.

Le butanol imprégnant le papier s'évapore et au bout d'une heure environ le papier est presque sec. A ce moment, on aère la cage et on coupe les bandes témoins sur lesquelles on pulvérise le vert de bromocrésol et qui donnent les indications nécessaires pour couper les autres bandes.

On renouvelle l'aération de la cage après dix minutes et on mesure l'alcalinité du papier par dépôt d'une goutte de solution de vert de bromocrésol (à 0,5 % dans éthanol-butanol v/v) toutes les cinq minutes environ. Quand le virage au bleu de

FIGURE 10 :

: Importance des pertes lors de séchage en atmosphère non contrôlée



Acétate d'éthylamine : gouttes de 0,0017 cm³ de solution N/10 dans 10 cm³ d'eau

... Conductivité obtenue en mettant les taches du chromatogramme dans l'eau distillée

— Conductivité obtenue en mettant directement les gouttes dans l'eau distillée

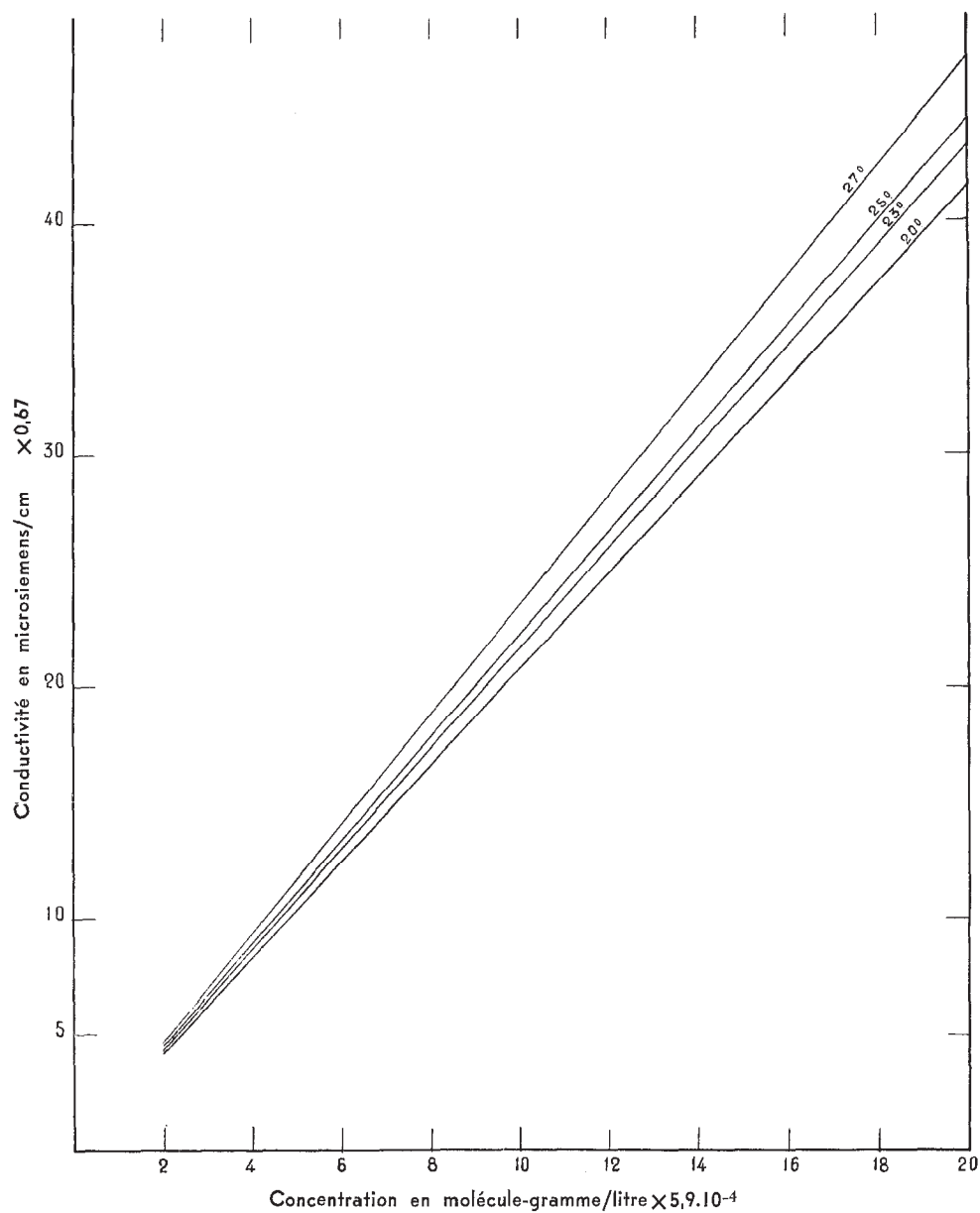


FIGURE II

Conductivité des solutions d'acétate d'éthylamine en fonction de la concentration et à différentes températures

l'indicateur se fait assez lentement, le papier qui ne contient presque plus d'éthylamine, est sorti de la cage. On peut également contrôler l'évaporation de l'éthylamine en mettant une certaine surface de papier dans l'eau distillée et en mesurant la baisse de résistivité toutes les cinq minutes par exemple. Il faut se débarrasser le plus possible de l'éthylamine pour ne pas gêner l'ionisation des sels lorsqu'ils se-

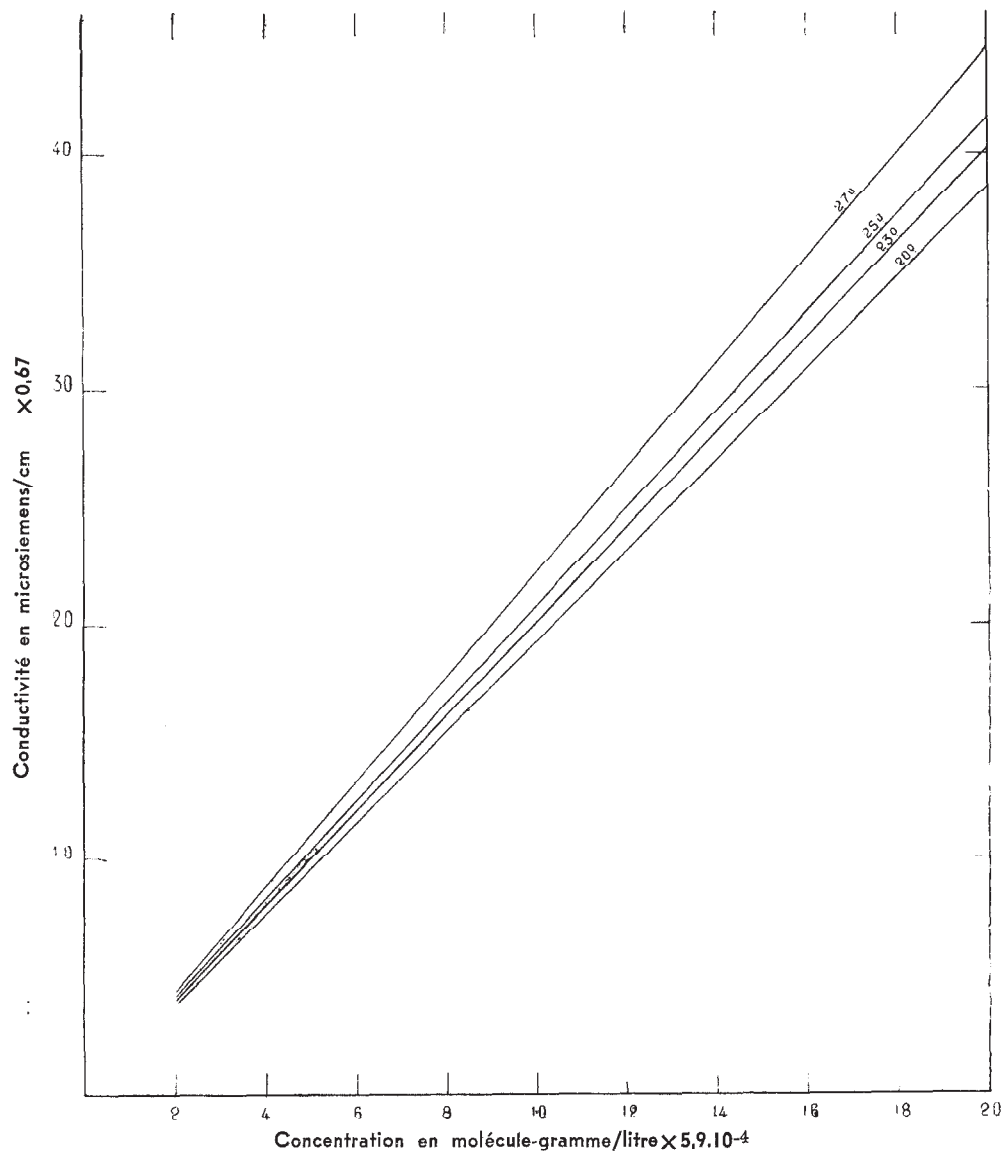


FIGURE 12

Conductivité de solutions de propionate d'éthylamine en fonction de la concentration et à différentes températures

ront mis en solution dans l'eau distillée et parce que sa répartition sur le papier n'est pas très uniforme à fortes concentrations alors qu'elle est plus constante à doses infimes.

Il faut aussi ne pas pousser trop loin le séchage, car la dissociation amène de nouveau des pertes. Ce séchage est l'opération la plus délicate du dosage.

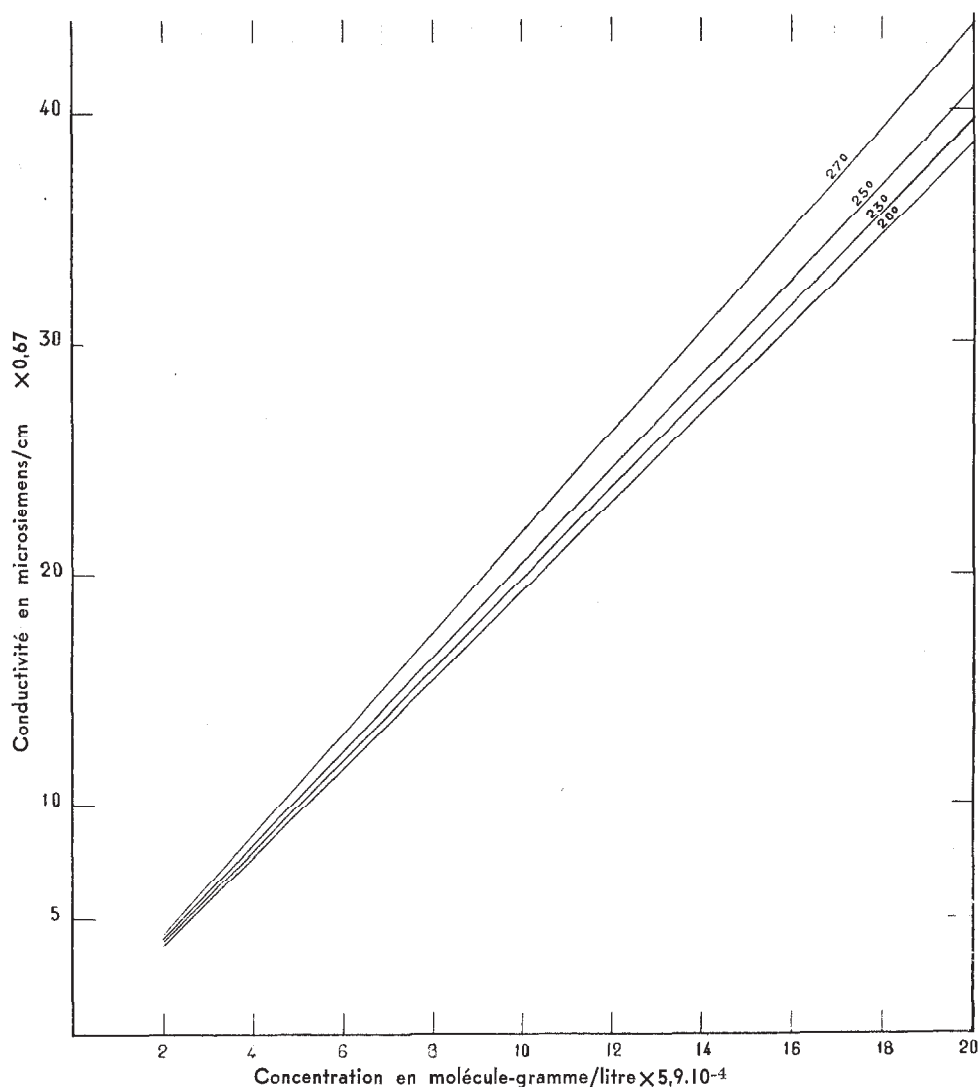


FIGURE 13

Conductivité de solutions de butyrate d'éthylamine en fonction de la concentration et à différentes températures

Dissolution des taches et mesure des conductivités :

Toutes les manipulations se font avec des pinces métalliques sauf pour les feuilles entières dont on ne touche avec les doigts que les extrémités. Lorsque le papier est jugé suffisamment sec (environ une heure et demie après sa sortie de la cuve) on coupe les bandes d'après les indications fournies par les bandes témoins (on ne peut pulvériser du vert de bromocrésol sur les bandes servant au dosage, car la pulvérisation amène des impuretés réparties irrégulièrement et par conséquent nuisibles au dosage). Chacun des morceaux de papier obtenus est marqué au crayon

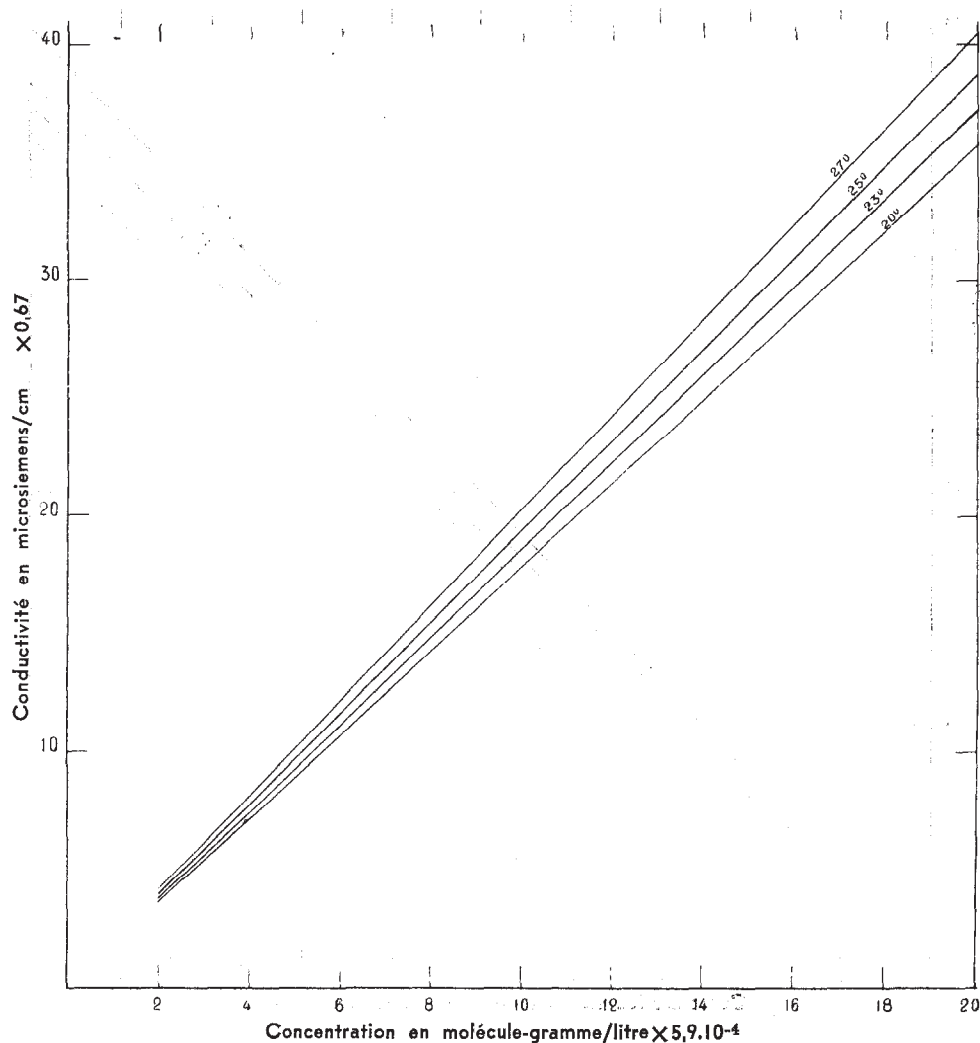


FIGURE 14

Conductivité de solutions de valérianate d'éthylamine en fonction de la concentration et à différentes températures

et mis dans un tube de verre contenant 10 cm³ d'eau bi-distillée (de conductivité environ $1 \cdot 10^{-8}$ ohm⁻¹ cm⁻¹). Les tubes de verre sont en pyrex, car le verre ordinaire amène des ions en assez grande quantité et de façon très inégale.

Les morceaux de bandes contenant les taches sont laissés en contact avec l'eau pendant quatre heures environ, au cours desquelles on fait subir aux tubes deux vigoureuses agitations. Au bout de ces quatre heures, on mesure la résistivité des solutions, au pont de Kohlrausch, après les avoir bien homogénéisés par une nouvelle agitation. Les mesures doivent se faire à température constante et exactement connue.

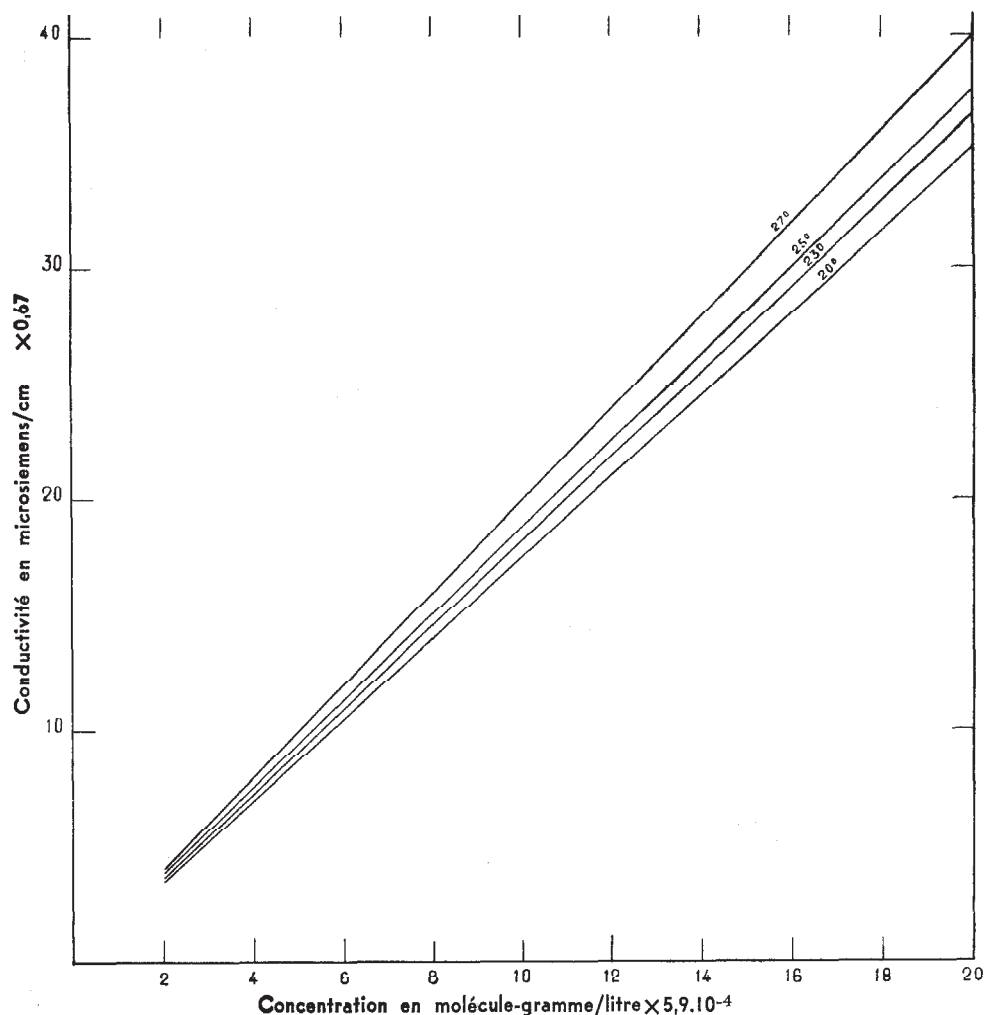


FIGURE 15

Conductivité des solutions de caproate d'éthylamine en fonction de la concentration et à différentes températures

L'appareil donne deux résultats :

R_t la résistance de la solution contenant le sel d'un acide

R_i la résistance d'une solution contenant la même dose d'impuretés.

On calcule la quantité $\left(\frac{1}{R_t} - \frac{1}{R_i} \right)$ et en se reportant aux graphiques construits spécialement (figures 11 à 15), on en déduit la teneur initiale de la solution.

On arrive avec cette méthode à un dosage qui dépend du soin apporté à limiter les pertes par dissociation, notamment lors du séchage du chromatogramme. Si celui-là a été bien conduit, les erreurs possibles par défaut ne dépassent pas 6 %, tandis que les erreurs par excès sont inférieures à 3 %.

La sensibilité de détection est de l'ordre de $8 \cdot 10^{-8}$ molécule-gramme. Un dosage suffisamment exact demande une quantité minimum de $5 \cdot 10^{-7}$ molécule-gramme.

Pour les quantités supérieures, nous sommes limités par le fait que les taches deviennent trop grandes et se séparent peu rapidement lorsque chacune d'elles contient une quantité dépassant environ $2 \cdot 10^{-6}$ molécule-gramme.

Dans ces conditions, il convient, pour faire les spots, d'utiliser des liquides ayant une concentration en chaque acide comprise entre N/50 et N/2.

Nous avons essayé d'éviter les erreurs dues à la dissociation des sels en employant une base moins volatile : la morpholine. La technique est exactement identique : sels de morpholine séparés avec du butanol saturé d'eau sur papier Whatman n° 1 et dans une atmosphère contenant de la morpholine. Mais cette base se fixe assez fortement sur le papier, pour l'évaporer il faut beaucoup plus de temps qu'avec l'éthylamine et l'on obtient des pertes équivalentes.

Il est peut-être possible de trouver une base organique forte, non volatile et donnant une séparation chromatographique facile, ou d'employer les sels de sodium ou de potassium à condition de posséder un solvant les séparant convenablement.

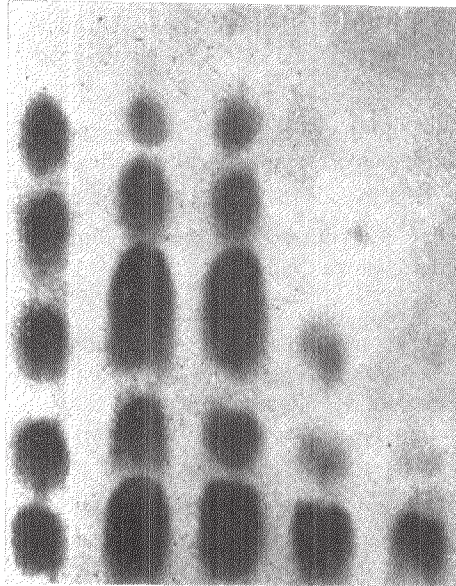


PHOTO I (a)

**CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS
VOLATILS EXTRAITS DE MARC DE RAISIN**

Fermentation à prédominance acéto-butyrique contenant 3/4 d'acide acétique et butyrique en proportion égale et 1/4 d'acide propionique, valériannique et caproïque.

De gauche à droite : Témoin 1^{er} fraction du distillat, 2^e, 3^e et dernière.

(Se reporter au 1^{er} tableau de dosage).

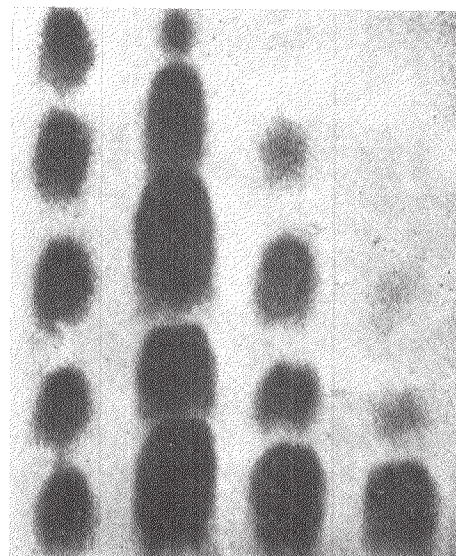


PHOTO I (b)

**CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS
VOLATILS EXTRAITS DE MARC DE RAISIN**

Fermentation de marc à prédominance acétique comprenant environ 50 % d'acide acétique, 25 % d'acide butyrique et 25 % d'acide propionique et valériannique avec des traces d'acide caproïque.

Témoin, 1^{er}, 2^e et 3^e distillat.

(Se reporter au 2^e tableau de dosage.)

CHAPITRE II

APPLICATIONS PRATIQUES A QUELQUES TYPES DE FERMENTATIONS

Nous allons examiner dans ce dernier chapitre quelques analyses d'acides gras volatils en provenance de diverses fermentations dont l'étude peut bénéficier de cette méthode d'analyse.

Dans ces divers exemples, le processus d'isolement des acides gras volatils est toujours le même :

La matière contenant les acides gras est pesée, mise dans un ballon de verre, additionnée d'un certain volume d'eau et d'acide sulfurique. Il est nécessaire d'acidifier avec un acide fort en excès afin de déplacer tous les acides gras volatils de leurs combinaisons et d'avoir un dosage de l'acidité volatile totale. En effet, dans les fermentations telle que la fermentation méthanique, c'est la quantité totale de sels d'acides gras volatils qui conditionne le volume de gaz produit. [45]

Après un contact d'au moins 24 heures et quelques agitations, la matière est portée à l'ébullition et le distillat recueilli par fractions de 100 cm³ ordinairement.

— Si l'acidité volatile est forte (distillat de titre supérieur à N/50 en chaque acide), une partie du distillat est additionnée d'un excès connu de solution d'éthylamine et la solution de sels ainsi obtenue est analysée qualitativement, puis quantitativement par chromatographie.

— Si l'acidité volatile est faible, le distillat est neutralisé par un excès de potasse, concentré par ébullition et la liqueur alors obtenue est acidifiée par de l'acide sulfurique et redistillée presque jusqu'à sec. La solution concentrée d'acides est comme précédemment neutralisée avec de l'éthylamine et soumise à l'analyse.

Les produits suivants ont été analysés : marcs de raisin, vins, fermentations d'amidons et de paille, ensilages, eaux résiduaires et résidus de fermentation méthanique.

MARCS DE RAISIN :

Les marcs de raisin subissent comme beaucoup de déchets végétaux des fermentations les rendant très acides (et bien souvent inutilisables).

Nous en avons analysé divers échantillons.

— Deux marcs au cours d'une bonne fermentation présentent une gamme de 5 acides : acétique, propionique, butyrique, valériannique et caproïque avec prédominance acéto-butyrique. (Photo 1)

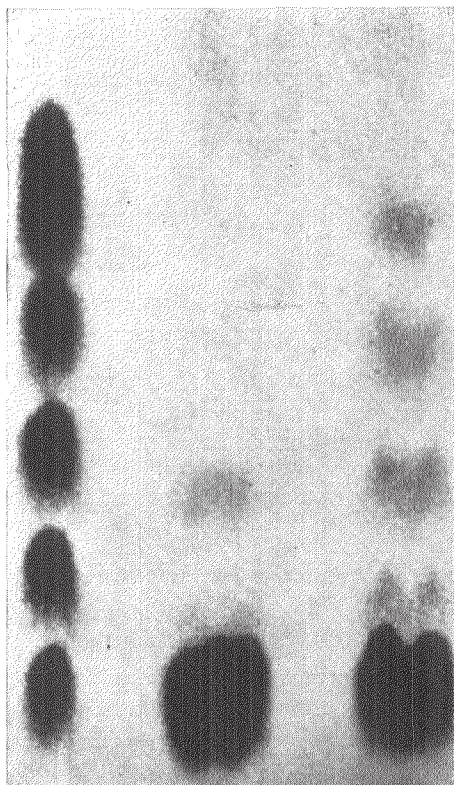


PHOTO II

CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS
VOLATILS EXTRAITS DE DEUX VIEUX MARCS
DE RAISIN MOISIS

A remarquer la disparition des acides gras
volatils supérieurs à C2.

Témoin, 1^{er} et 2^e marc.

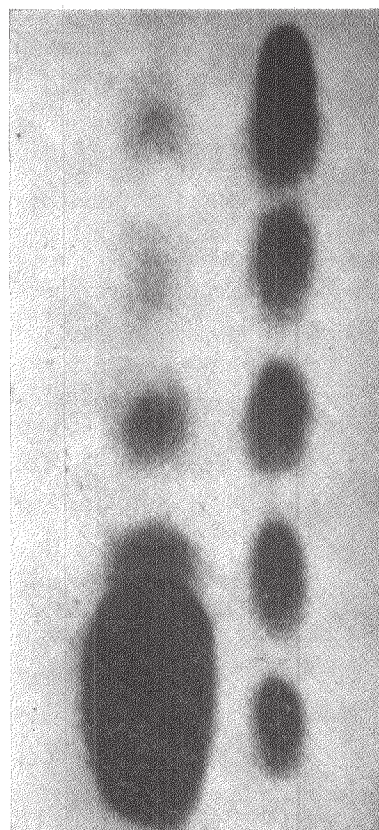


PHOTO III

CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS
VOLATILS EXTRAITS D'UN VIN NORMAL

On remarque que l'acidité volatile est pres-
que exclusivement due à la présence d'acide
acétique.

Néanmoins, le chromatogramme révèle la
présence de traces d'acide propionique, buty-
rique, valériannique, caproïque et œnanthylique
(non visible sur la photo).

Le dosage conductimétrique a donné les résultats suivants :

TABEAU II

Dosage (en grammes) des acides gras volatils dans les différentes fractions du distillat recueilli à partir de 1 kg de marc, dont l'humidité est de 55,6 % soit 444 g de matière sèche, additionné de 1,5 litre d'eau et distillé à volume constant.					
ACIDE	DISTILLAT				
	1 ^{er} de 2 l.	2 ^e de 1 l.	3 ^e de 1 l.	4 ^e de 1 l.	Total
Acétique. . . .	1,40	0,90	0,53	0,40	3,23
Propionique. . .	0,51	0,36	traces	0	0,87
Butyrique. . . .	1,72	1,32	0,06	0	3,10
Valérianique. .	0,45	0,36	traces	0	0,81
Caproïque. . . .	0,31	0,20	traces	0	0,51

TABEAU III

Dosage (en grammes) des acides gras volatils dans les différentes fractions du distillat recueilli à partir de 100 g de marc dont l'humidité est de 50 % soit 50 g de matière sèche, additionnés de 0,5 litre d'eau et distillés à volume constant.				
ACIDE	DISTILLAT			
	1 ^{er} de 150 cm ²	2 ^e de 850 cm ³	3 ^e de 500 cm ³	Total
Acétique. . . .	0,10	0,32	0,10	0,52
Propionique. . .	0,06	0,11	traces	0,17
Butyrique. . . .	0,13	0,14	traces	0,27
Valérianique. .	0,06	traces	0	0,06
Caproïque. . . .	traces	0	0	traces

Comme dans la chromatographie de ces sels d'éthylamine, le formiate se confond avec l'acétate, nous avons pratiqué une séparation des hydroxamates dans laquelle l'acide formique et l'acide acétique sont à l'origine de taches bien distinctes. Nous n'avons décelé aucune trace d'acide formique.

— Deux autres marcs, plus vieux, de Ph plus élevé et présentant un taux d'humidité (26 et 35 %) très inférieur, ne contiennent plus que de l'acide acétique et des traces des quatre autres acides. (Photo 2)

Au cours du vieillissement, les acides ont disparu soit évaporés, soit consommés par des moisissures secondaires.

VINS :

Aussi bien dans un vin tourné que dans un vin sain dont nous avons extrait les acides gras volatils, nous avons trouvé de l'acide acétique accompagné de traces d'acides supérieurs : C₃, C₄, C₅, C₆, C₇ (Photo 3) ; dans le vin tourné l'acide acétique est naturellement en quantité plus importante que dans le vin normal.

PHOTO IV

CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS
VOLATILS EXTRAITS D'UNE FERMENTATION
DE HARICOTS ET DE POMMES DE TERRE
A PREDOMINANCE FORTEMENT BUTYRIQUE

Environ $\frac{2}{3}$ d'acide butyrique, $\frac{1}{5}$ d'acide
acétique, $\frac{1}{10}$ d'acide propionique et des tra-
ces d'acide valérianique.

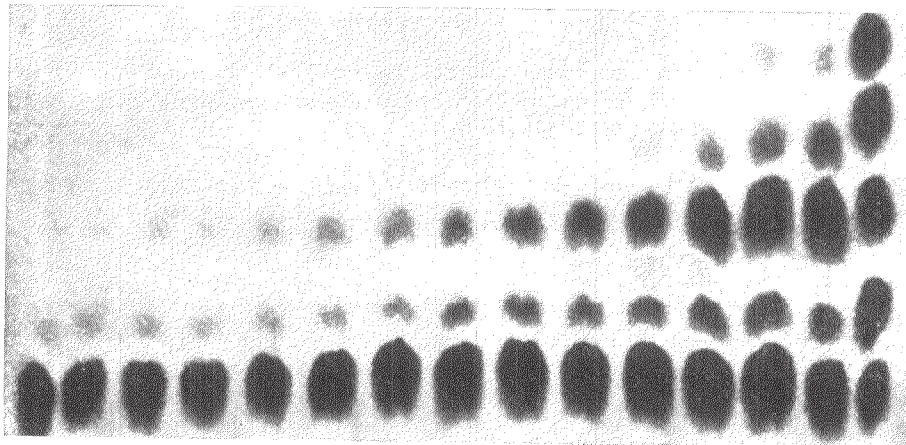


PHOTO V

ALLURE D'UNE DISTILLATION FRACTION-
NEE A VOLUME CONSTANT D'ACIDES
GRAS VOLATILS

On remarque l'entraînement rapide des aci-
des gras supérieurs et l'extraction difficile et
incomplète de l'acide acétique.

De droite à gauche : Témoin, tête, corps et
queue de distillation réduite à 14 fractions.



On imagine donc facilement toutes les applications possibles de la méthode chromatographique de dosage en œnologie : analyses des vins sains et malades ; analyses des différentes fermentations des marcs, puis contrôle et orientation de ces fermentations afin d'obtenir les meilleurs engrais à partir de ces marcs dont le tonnage annuel est considérable.

FERMENTATION BUTYRIQUE :

Une fermentation butyrique classique a été provoquée par du purin 50 cm³
dans un milieu ayant la composition suivante :
pomme de terre 87 g
haricots blancs secs 20 g
carbonate de calcium 25 g
eau q.s.p. 1.000 cm³

Après fermentation d'une semaine à 35°, la distillation d'un volume de 3 litres a permis d'isoler la presque totalité des acides volatils qui se répartissent ainsi :

-- acide acétique..	0,90 g
-- acide propionique..	0,52 g
-- acide butyrique..	3,10 g
-- acide valérianique..	traces

L'acide butyrique est nettement prépondérant, mais il existe aussi des acides acétique, propionique et valérianique. (Photo 4)

ALLURE D'UNE DISTILLATION FRACTIONNEE :

A propos d'un ensilage, nous avons voulu étudier l'allure générale d'une distillation fractionnée. Pour cela, nous avons recueilli à partir de 250 grammes d'ensilage, 3 litres de distillat en 30 fractions de 100 cm³ chacune. Puis chaque fraction a fait l'objet d'une séparation chromatographique des acides gras volatils. Nous avons alors obtenu le chromatogramme de la photographie 5 qui montre que les acides à haut poids moléculaire passent en tête de distillation, tandis que les acides de faible poids moléculaire continuent de passer jusqu'à la fin de notre distillation : ainsi l'acide acétique n'a pas été épuisé par 3 litres de distillat pour les 250 grammes de matière. Comme dans ces distillations, on peut ne peut extraire la totalité des acides gras volatils, que la distillation est longue et que l'on est souvent obligé de faire une concentration du distillat s'éloignant de la tête, il sera avantageux au cours d'une étude en série, d'utiliser la remarque précédente et d'analyser seulement les 100 ou 200 cm³ de tête de distillation à condition de prendre toujours le même poids de matière première sèche en présence de la même quantité d'eau.

ENSILAGES :

La qualité d'un ensilage se jugeait jusqu'à présent aux taux des acides acétique, butyrique et lactique (exemple : « Terre Algérienne » du 13 juillet 1957) [46] : on ne tenait donc compte dans la méthode d'analyse quantitative par distillation du Dr Flieg (1938) que de la présence des acides acétique et butyrique. En 1940, d'après Prescott-Dunn [47] et en 1953 d'après Gloppe-Hvidsten [48], on rencontre également dans les fermentations de fourrage ensilé de l'acide propionique et parfois de l'acide formique.



PHOTO VI

CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS VOLATILS EXTRAITS D'ENSILAGE DE TREFLE-AVOINE AU DEBUT DE SA FERMENTATION

Ce chromatogramme est caractérisé par une proportion élevée d'acide caproïque et également par la présence de notables quantités d'acide œnanthylique.

Composition environ :

- 50 % d'acide acétique
- 20 % d'acide butyrique
- 15 % d'acide caproïque
- 5 % d'acide propionique
- 5 % d'acide valérianique
- 5 % d'acide œnanthylique

Témoin, tête, corps et queue.

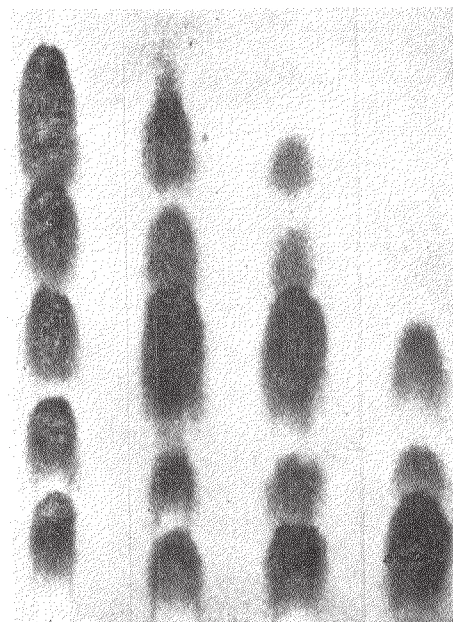


PHOTO VII

CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS VOLATILS EXTRAITS D'ENSILAGE DE RAVE-NELLE AU MILIEU DE SA FERMENTATION

Composition de l'ordre de :

- 50 % d'acide butyrique,
- 25 % d'acide acétique,
- 25 % d'acide propionique, valérianique, caproïque avec quelques traces d'acide œnanthylique.

Témoin, tête, corps, queue.

Cependant, des analyses que nous avons faites (1957) nous ont montré que l'acide formique était absent et que les acides supérieurs n'étaient pas au nombre de 3, mais au nombre de 5 et parfois de 6 : acides acétique, propionique, butyrique, valérianique, caproïque et œnanthylique (Photo 6). Il faut noter que cet acide œnanthylique (C_7) trouvé dans une fermentation est très rare puisque dans le traité de Microbiologie Pratique [49], on lit à propos des productions par les espèces anaérobies : « ... Seuls les acides de C_1 à C_6 ont été rencontrés jusqu'ici ».

Par conséquent, une méthode apte à doser ces six acides est plus avantageuse et plus près de la réalité que celles qui n'en mentionnaient que deux, trois ou quatre. Le progrès obtenu est susceptible d'améliorer la conduite des fermentations d'ensilage : pratique dont l'importance est essentielle dans les régions d'élevage et dans les pays méditerranéens. [50]

Ensilage de ravenelle :

On trouve en tête de distillation de cet échantillon une forte proportion d'acide butyrique, d'acide valérianique et d'acide caproïque ; et une trace d'acide œnanthylique. (Photo 7 et tableau IV)

Ensilage de trèfle-avoine :

On note, par contre, la présence de beaucoup plus d'acide œnanthylique dans un ensilage de fourrage ordinaire ; moins d'acide butyrique et d'acide valérianique. (Photo 6 et tableau IV). Par contre, ce même fourrage, aux premiers jours de fermentation, présente de l'acide acétique (ce qui est normal puisque les plantes contiennent en général des acétates) et des traces de propionique et de butyrique.

TABLEAU IV

Dosage (en gramme) des acides gras volatils dans les différentes fractions du distillat recueilli à partir d'ensilages : 200 grammes de matière ensilée, dont l'humidité est pour les deux exemples de 82 % soit 36 grammes de matière sèche, additionnés de 700 cm ³ d'eau, et distillés à volume constant.						
ACIDE	ENSILAGE I ravenelle			ENSILAGE II trèfle-avoine		
	tête 200 cm ³	corps 700 cm ³	queue 400 cm ³	tête 200 cm ³	corps 700 cm ³	queue 400 cm ³
Acétique	0,05	0,27	0,33	0,16	0,50	0,28
Propionique	0,04	0,10	0,02	0,04	0,06	0,01
Butyrique	0,40	0,60	0,07	0,15	0,19	0,02
Valérianique	0,13	0,08	0	0,07	0,05	0
Caproïque	0,22	0,10	0	0,18	0,07	0
œnanthylique	traces	0	0	(1) 0,10	0	0

FERMENTATION DE PAILLE DE SORGHO :

Un essai de fermentation de 100 g de paille de sorgho
ensemencés par 100 cm³ de purin,
additionnés de 700 cm³ d'eau

(1) Dosage par différence (acide œnanthylique = acidité totale — acidité des cinq premiers acides), car nous n'avons pas eu assez rapidement de l'acide œnanthylique pur pour faire notre courbe de conductivité en fonction de la concentration.

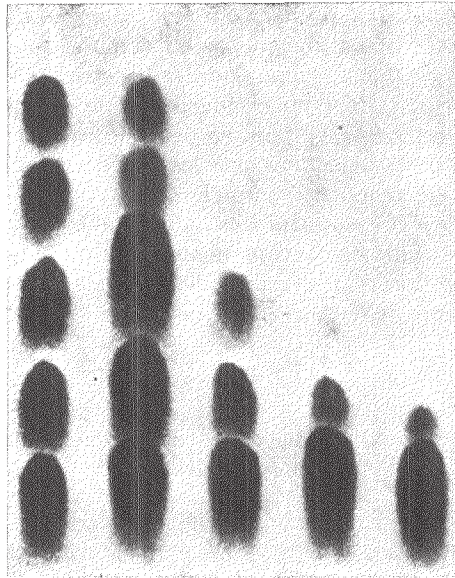


PHOTO VIII

CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS
VOLATILS EXTRAITS D'UNE FERMENTATION
DE PAILLE DE SORGHO

Fermentation se caractérisant par une proportion d'acide propionique deux fois et demie plus élevée que dans la fermentation butyrique.

Composition environ :

- 36 % d'acide butyrique
- 28 % d'acide acétique
- 25 % d'acide propionique
- 10 % d'acide valérienique et caproïque.

Témoin, tête, 3°, 4° et 5° distillat.

PHOTO IX

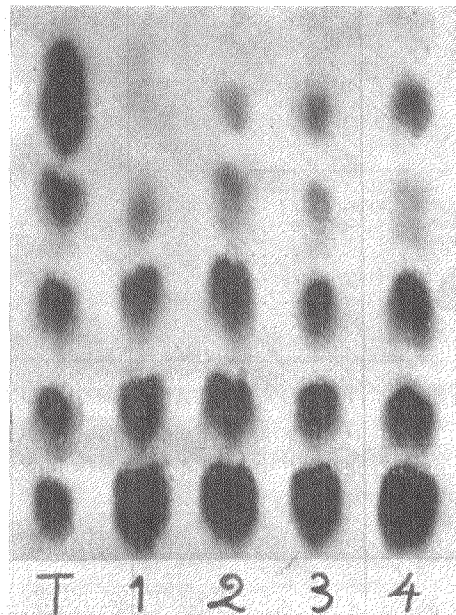
CHROMATOGRAMME DE TÊTE DE DISTILLATION
D'ACIDES GRAS VOLATILS EXTRAITS DE
RESIDUS DE FERMENTATION METHANIQUE
(PAILLE DE CEREALES)

On remarque que les pailles fournissent une proportion plus forte d'acide propionique que les autres matières végétales.

Composition moyenne :

- 40 % d'acide acétique
- 21 % d'acide propionique
- 21 % d'acide butyrique
- 11 % d'acide valérienique
- et 10 % d'acide caproïque et cœnanthylique.

De gauche à droite. Témoin, 4 échantillons différents.



et maintenu à 35° pendant 16 jours a permis de recueillir en tête de la distillation 200 cm³ contenant :

acide acétique..	0,47 g
acide propionique..	0,40 g
acide butyrique..	0,60 g
acide valérianique..	0,12 g
acide caproïque..	0,09 g

On note que l'on se trouve en présence d'une fermentation où le groupe acétique-propionique-butyrique prédomine. Un incident ne nous a pas permis d'obtenir le reste du distillat de façon assez précise pour en donner un dosage, mais la physiologie générale en est donnée par la photographie 8.

EAUX RESIDUAIRES :

Une analyse d'eaux et de boues en provenance de l'oued Harrach (près de l'embouchure où cet oued se transforme en collecteur d'égouts) nous a permis de déceler la présence à l'état de traces de la série d'acides suivants : acétique, propionique, butyrique et valérianique.

RESIDUS DE FERMENTATION METHANIQUE :

On sait que les détritiques les plus divers et en particulier ceux contenant beaucoup de cellulose, mis en milieu non oxygéné sont susceptibles dans certaines conditions et sous l'action de la faune et de la flore qu'ils renferment [51], de produire de grandes quantités de gaz carbonique et de méthane. Le méthane, résultat intéressant de cette fermentation, se forme à partir des acides gras volatils [52] et en particulier par décarboxylation de l'acide acétique [53] [54]. C'est pourquoi nous avons analysé divers échantillons provenant des cuves de production de méthane de P.E.N.A.A.

Nous y avons retrouvé les six acides : acétique, propionique, butyrique, valérianique, caproïque, œnanthylique, dans les proportions données par le tableau V. (Photo 9)

TABLEAU V

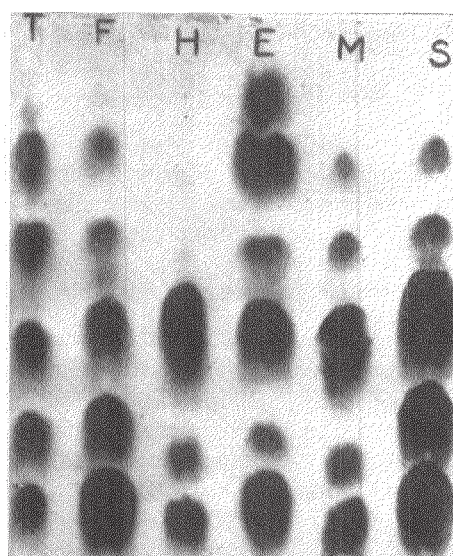
Dosage (en grammes des acides gras volatils contenus dans les premiers 200 cm ³ de tête du distillat de résidus de fermentation méthanique : Résidu 1 provenant du milieu d'une cuve en pleine fermentation. Résidu 2 provenant du milieu d'une cuve en fin de fermentation. Résidu 3 provenant du fond de la même cuve que le résidu 2. Résidu 4 provenant du fond d'une cuve en fin de fermentation. 800 grammes de matière (humidité de 75 %) étant additionnés de 500 cm ³ d'eau.				
ACIDE	DISTILLAT : 200 cm ³ de tête			
	résidu 1	résidu 2	Résidu 3	résidu 4
Acétique.. . . .	0,20	0,21	0,19	0,20
Propionique.. . .	0,11	0,13	0,10	0,10
Butyrique.. . . .	0,10	0,14	0,09	0,11
Valérianique.. . .	0,06	0,08	0,05	0,04
Caproïque.. . . .	0,02	0,05	0,05	0,05
œnanthylique.. . .	traces	traces	traces	traces

Les quatre exemples précédents sont les premiers d'une longue série d'analyse d'échantillons provenant de cuves de production de méthane et d'essais de laboratoire et dont le « gaz de fumier » retirera sans aucun doute de notables améliorations.

PHOTO X
CHROMATOGRAMME D'ACIDES GRAS
VOLATILS DES DIVERSES FERMENTATIONS

Tableau récapitulatif de comparaison des
produits de fermentation de

Fumier,
Haricots,
Ensilage,
Marc et
Sorgho.



RESUME ET CONCLUSIONS

Dans la première partie de cet exposé, nous avons eu l'occasion de signaler la rareté des méthodes de dosage applicables aux mélanges complexes d'acides gras volatils. De plus, ces méthodes n'étaient pas pratiques et étaient difficilement accessibles à un manipulateur moyen et à un laboratoire non pourvu d'appareils spéciaux.

Dans la deuxième partie, nous avons exposé une méthode simple de chromatographie sur papier, convenant bien aux mélanges de nombreux acides gras volatils recueillis par distillation à la vapeur. Puis nous avons montré comment cette méthode pouvait être améliorée, notamment par la plastification des chromatogrammes et pouvait être à la base d'un dosage conductimétrique. Ce dosage est basé sur la relation $\sigma = k \cdot c$ entre la conductivité σ et la concentration c ; et sur le fait que la conductivité totale est la somme de la conductivité du sel d'éthylamine et de la conductivité de l'eau et des impuretés.

Enfin nous avons vu quelques applications possibles de cette méthode, ce qui nous a permis de noter que dans les différents types de fermentations on retrouvait en général toujours les mêmes acides mais en proportions variables et que parfois on pouvait mettre en évidence de l'acide œnanthylique dont la présence n'avait pas été signalée jusqu'à présent.

Le domaine d'application de cette méthode peut, en résumé, s'étendre aux principaux types de fermentation suivants :

- groupe des fermentations alcooliques : éthanol, butanol-acétone, butanol-isopropanol.
- groupe des fermentations acétiques des vins, des bières et des moûts.
- groupe des fermentations acéto-lactiques des brasseries, des vins, des produits laitiers et des sucreries.
- groupe des fermentations anaérobies à sporulation telle que celles données par :
Clostridium butyricum
Clostridium saccharobutyricum
Clostridium pasteurianum.
- groupe des fermentations protéolytiques.
- groupe des fermentations d'ensilages et rouissages.
- groupe des fermentations méthaniques.

Nous espérons

1°) que la pratique généralisée de la plastification permettra d'augmenter dans de larges proportions la conservation des chromatogrammes non permanents ;

2°) que la méthode de dosage conductimétrique des acides gras volatils sera d'une aide précieuse aux chercheurs étudiant les fermentations ;

3°) que l'on pourra étendre le principe de la méthode aux dosages de composés séparables par chromatographie et susceptibles d'ionisation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. DENIGÈS : *Cité par R. TRUCHET* : les monoacides *in* V. GRIGNARD, G. DUPONT et R. LOCQUIN. *Traité de Chimie Organique*, Paris, *Masson*, IX, 1939, p. 14.
- [2] PHELPS et PALMER : *J. Biol. Chem.*, XXIX, 1917, p. 202.
- [3] BOSSHARD et COMTE : *Helv. Chem. Act.*, I, 1918, p. 257.
- [4] G. BERTRAND : *Cité par A. et R. SARTORY et J. MEYER*. *Microbiologie pratique*, Paris, *Maloine*, 1950, p. 320.
- [5] BEHRENS-KLEY : *Cité par A. et R. SARTORY et J. MEYER*. *Microbiologie pratique*, Paris, *Maloine*, 1950, p. 320.
- [6] GARRAUD : Thèse de Pharmacie. Bordeaux 1897.
- [7] BEHRENS : *Z. Anal. Chem.*, LXIX, 1926, p. 97.
- [8] DUCLAUX : *Traité de Microbiologie*, Paris, *Masson*, T. III, 1893, p. 385.
- [9] DUCLAUX : *Ann. Chim.*, VI, 1886, 8, p. 452.
- [10] DUCLAUX : *Ann. Inst. Pasteur*. 1892, p. 265.
- [11] G. DENIGÈS, L. CHELLE, A. LABAT : *Précis de Chimie Analytique*, Paris, *Maloine*, 1931, p. 514.
- [12] G. DENIGÈS, L. CHELLE, A. LABAT : *Précis de Chimie Analytique*, Paris, *Maloine*, 1931, p. 516.
- [13] O. FLIEG : Ein Schlüssel zur Bewertung von Garfütterproben, *Futterbau und Gröfütterbereitung*, I, 1938, p. 121-128.
- [14] F. ANSTETT : Rapport de stage à la Station de Recherches agronomiques de l'IG. Farbenindustrie, Limburgerhof, 1948, *dactylographié, inédit*.
- [15] L.C. CRAIG : *J. Biol. Chem.*, CLV, 1944, p. 519-534.
- [16] D. PILLOIN : *Bull. Soc. Chim. France*, 1952, I, p. DI.
- [17] L.C. CRAIG : *Forschr. Chem. Forsch.*, I, 1949, p. 292-293.
- [18] Y. SATO, G.T. BARRY et L.C. CRAIG : *J. Biol. Chem.*, CLXX, 1947, p. 501.
- [19] A.T. JAMES et A.J.P. MARTIN : *Biochem. J.*, LII, 1952, p. 242.
- [20] P. CHIOVIN : *Bull. Soc. Chim. France*, LXXXIII, 1957, p. 101.
- [21] A.T. JAMES et A.J.P. MARTIN : *Analyst.*, LXXVII, 1952, p. 915.
- [22] A.J.P. MARTIN et A.T. JAMES : *Biochem. J.*, L, 1952, p. 679.
- [23] S.R. ELSDEN : *Biochem. J.*, XI, 1946, p. 252.
- [24] A.C. NEISH : *Can. J. Res.*, XXVIIIb, 1949, 6.
- [25] H.J. NIJKAMP : *Chem. Weekblad.*, XLV, 1949, p. 480.
- [26] R. SCARISBRICK, E. BALDWIN et V. MOYLE : *Biochem. J.*, XLIII, 1948.
- [27] E. et M. LEDERER : « *Chromatography* », Amsterdam, *Elsevier Publishing Company*, 1953, p. 124.
- [28] J. ASSELINEAU : *Bull. Soc. Chim. France*, 1952, p. 884-891.

- [29] E. et M. LEDERER : « Chromatography », Amsterdam, *Elsevier Publishing Company*, 1953, p. 123-125.
- [30] K. SATAKE et T. SEKI : *J. Japan Chem.*, IV, 1950, p. 557.
- [31] F. FEIGL : Manual of Spots test, New-York, *Academic Press*, 1943.
- [32] K. FINK et R.M. FINK : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, LXX, 1949, p. 654.
- [33] A.R. THOMPSON : *Australian J. Sci. Res.*, IX, 1951, p. 180.
- [34] R. BLOCK, E. DURRUM et G. ZWEIG : A Manual of paper chromatography and paper electrophoresis, New-York, *Academic Press*, 1955, p. 164-165.
- [35] F. BROWN : *Biochem. J.*, XLVII, 1950, p. 598-600.
- [36] E.P. KENNEDY et H.A. BARKER : *Anal. Chem.*, XXIII, 1951, p. 1.033-1.034.
- [37] F.A. ISHERWOOD et C.S. HANES : *Biochem. J.*, LV, 1953, p. 824.
- [38] R.L. REID et M. LEDERER : *Biochem. J.*, L, 1951, p. 60.
- [39] J. GUILLAUME et R. OSTEUX : *C. R. Acad. Sciences*, CCXLI, 1955, p. 501.
- [40] R.B. FISHER et R. HOLMES : *Biochem. J.*, XLIV, 1949.
- [41] R.B. FISHER, D.S. PARSONS et G.A. MORRISON : *Nature*, CLXI, p. 76.
- [42] R.C. BRIMLEY : *Nature*, CLXIII, 1949, p. 215.
- [43] M. LEDERER : *J. Proc. Roy. Australian Chem. Inst.*, 1950, p. 308.
- [44] E.R. HISCOX et N.J. BERRIDGE : *Nature*, CLXVI, 1950, p. 522.
- [45] L.A. UNDERKOFER et R.J. HICKEY : « Industrial Fermentations », New-York, *Chemical Publishing*, 1954, vol. II, p. 522.
- [46] B. FAURE et A. GROSRENAUD : « *Terre Algérienne* » du 13 juillet 1957.
- [47] S.C. PRESCOTT et C.G. DUNN : « Industrial Microbiology », New-York, *Mc Graw-Hill Book Company*, 1940, p. 302.
- [48] K.E. GLOPPE et H. HVIDSTEN : « Determination of volatile fatty acids in silage by distillation and by chromatographic methods », *Z. Tierernähr. Dtsch.*, X, 1955, n° 3, p. 129-134.
- [49] E. et R. SARTORY, J. MEYER : « Microbiologie Pratique », Paris, *Maloine*, 1950, p. 297.
- [50] A.T. SEMPLE : « Important Consideration in the use of silage », *Food and Agricultural Organization of the United Nations*, 2 nd Meeting, Algier 28 April-3 May 1953.
- [51] S.E. WAKSMAN : « Soil Microbiology », New-York, *John Wiley et Sons*, 1952, p. 95.
- [52] G. DUCELLIER et M. ISMAN : *Agria* 1953, n° 166.
- [53] T.C. STADTMAN et H.A. BARKER : *Arch. Biochem.*, XXI, 1949, p. 256.
- [54] A.M. BUSWELL et F.W. SOLLO : *J. Am. Soc.*, LXX, 1948, p. 1.778.

Imprimerie BARBRY
12, Rue Géricault
ALGER
—
1957

Dépôt légal n° 109 — NOVEMBRE 1957

**LES ANNALES DE L'INSTITUT AGRICOLE
ET DES SERVICES DE RECHERCHES
ET D'EXPERIMENTATION AGRICOLES DE L'ALGERIE**

sont servies :

a) Par abonnement

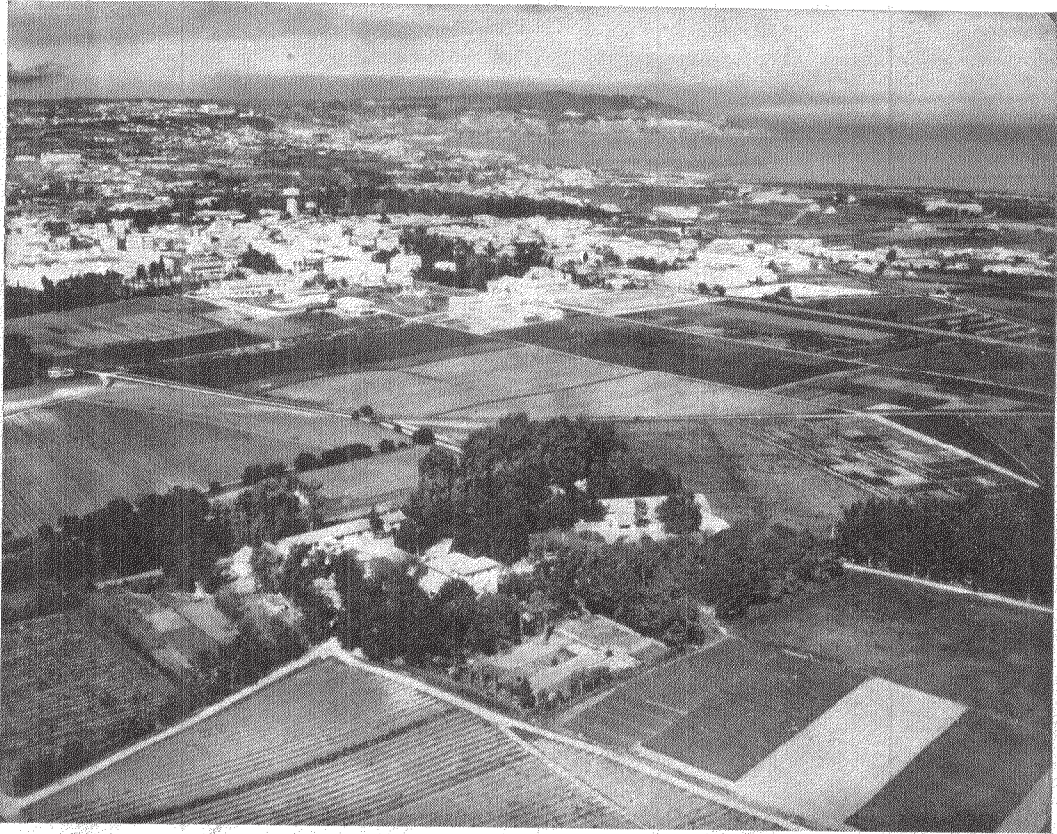
par souscription de 1.000 fr. par tome à verser au C.C.P. 330.660, ouvert au nom de l'Agent Comptable Econome de l'Institut Agricole d'Algérie à Maison-Carrée (Alger).

Cet abonnement comprend, en outre, les brochures de vulgarisation éditées par l'Inspection Générale et la Direction de l'Agriculture du Gouvernement Général de l'Algérie, à l'exception des brochures de caractère spécial à diffusion limitée.

b) Par échange

Les Annales de l'I.A.A. font l'objet d'échanges avec les publications similaires des Services et Universités Agricoles de France et de l'Etranger.

[Retour au menu](#)



Ecole Nationale d'Agriculture d'Alger et la baie d'Alger
Au premier plan : Ferme centrale

L'Institut Agricole d'Algérie, assimilé aux Ecoles Nationales d'Agriculture métropolitaines (GRIGNON, MONTPELLIER et RENNES), par la loi du 22 mai 1946 délivre le diplôme d'Ingénieur Agricole.