

TECHNIQUES DE LABORATOIRE

6603674

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION

J. LOISELEUR

Chef de Service à l'Institut Pasteur

TOME I

(PREMIER FASCICULE)

CHIMIE PHYSIQUE
CHIMIE BIOLOGIQUE

TROISIÈME ÉDITION
ENTIÈREMENT REMANIÉE

PRÉFACE DU P^r J. TRÉFOUËL

MASSON et C^{ie} ÉDITEURS PARIS
120, boulevard Saint-Germain, Paris-6^e

1963

A LA MÊME LIBRAIRIE

PRATIQUE DU LABORATOIRE. *Techniques générales. Diagnostics biologiques. Hématologie. Sérologie. Parasitologie et entomologie médicales. Technique anatomo-pathologique.* (Commission de rédaction : CH. JAULMES, A. JUDE et J. QUERANGAL DES ESSARTS). 3^e édition (sous presse).

TECHNIQUES DE LABORATOIRE APPLIQUÉES AU DIAGNOSTIC DES MALADIES A VIRUS, par P. LÉPINE et R. SOHIER. 1953. Un volume de 496 pages, avec quelques figures.

ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE. *Ses applications aux liquides biologiques humains*, par P. GRABAR, P. BURTIN et collaborateurs. 1960. Un volume de 294 pages, avec 93 figures.

CHROMATOGRAPHIE EN CHIMIE ORGANIQUE ET BIOLOGIQUE, par E. LEDERER et collaborateurs. (*Collection de monographies de chimie organique, II et III*).

Volume I. *Généralités. Applications en chimie organique.* 1959, 672 pages, 164 figures, 144 tableaux.

Volume II. — *Applications en chimie biologique.* 1960, 876 pages, 98 figures, 25 tableaux.

MICROCALORIMÉTRIE. *Applications physico-chimiques et biologiques*, par E. CALVET et R. PRAT. 1956, un volume de 396 pages, avec 168 figures.

TRAITÉ DE MICROSCOPIE. *Instruments et techniques*, par A. POLICARD, M. BESIS et M. LOCQUIN. 1957, un volume de 610 pages, avec 178 figures.

TRAITÉ DE BIOCHIMIE GÉNÉRALE, par M. JAVILLIER, M. POLONOVSKI, M. FLORKIN, P. BOULANGER, M. LEMOIGNE, J. ROCHE, R. WURMSER et J. POLONOVSKI.

Tome I. — *Composition chimique des organismes.* 1959, 1476 pages, 196 figures.

Tome II. — *Les agents des synthèses et des dégradations biochimiques.*

Fascicule I. — Vitamines. Oligo-éléments. Hormones. 1962, 700 pages, 35 figures, 58 tableaux.

Fascicule II. — Enzymes. (sous presse).

Tome III. — *Les processus biochimiques de synthèse et de dégradation et leurs coordinations* (en préparation).

MISES AU POINT DE CHIMIE ANALYTIQUE PURE ET APPLIQUÉE ET D'ANALYSE BROMATOLOGIQUE, sous la direction de J. A. GAUTIER (10 séries parues).

Tous droits d'adaptation, de traduction et de reproduction, même par tous procédés, y compris le microphone et la photographie, réservés pour tous pays.

PRÉFACE

DEPUIS LA PRÉFACE que j'avais eu le plaisir d'écrire pour la première édition de ces *Techniques de Laboratoire*, le succès des éditions successives montre que la conception de cet ouvrage répondait à un besoin. Homme de laboratoire, Loiseleur savait que seul, le spécialiste d'une question est capable de la rédiger. Dans cette 3^e édition, le nombre de ces collaborateurs s'est considérablement accru, ce qui correspond à l'extension actuelle des techniques auxquelles la Recherche fait un appel de plus en plus constant.

Comme pour la première édition, il m'est agréable de constater que beaucoup des collaborateurs travaillent dans les laboratoires de l'Institut Pasteur. A tous, je renouvelle les félicitations de la Direction de cet Institut en même temps que je souhaite à ce traité tout le succès qu'il mérite.

Jacques TRÉFOUËL,

Membre de l'Institut
et de l'Académie Nationale de Médecine,
Directeur de l'Institut Pasteur.

INTRODUCTION

Lorsqu'en 1947, la Librairie Masson me demanda de rédiger un ouvrage de techniques, je fis remarquer aux Éditeurs qu'un homme de laboratoire ne peut traiter que les techniques qu'il connaît parfaitement et que la diversité des travaux d'un laboratoire de recherches dépasse la compétence d'un seul travailleur : dans ces conditions, la seule façon d'envisager une telle édition consistait à faire appel à mes collègues, en confiant à chacun la rédaction de ses techniques particulières. Le plan de l'ouvrage était disparate, le choix des techniques étant guidé par celles qui m'intéressaient particulièrement. La Direction de la Librairie Masson voulut bien approuver ce plan et l'épuisement successif de deux éditions semble appuyer ma conception initiale.

Dans cette troisième édition, les techniques sont toujours rédigées dans un double but : d'abord, trouver les techniques élémentaires qui sont constamment utilisées, telles que la simple préparation d'une liqueur titrée ou les microdosages; d'autre part, il arrive au cours d'une recherche de faire appel à des techniques nouvelles ou tout au moins, inhabituelles pour l'expérimentateur. On trouve alors dans l'ouvrage des mises au point d'un caractère général qui évitent un long travail de bibliographie. Par exemple, il est à penser que l'exposé des glucides envisagé par M^{lle} A.-M. Staub rendra service à plus d'un de nos collègues. Il est souvent tentant d'appliquer à la cancérologie l'emploi d'un produit nouveau. Pour un travailleur non initié, l'exposé de J.-F. Duplan ne manque pas d'être précieux. Chacun des différents chapitres mériterait la même appréciation. Beaucoup sont tentés d'utiliser l'élégante technique des éléments marqués; M^{me} P. Daudel vient en souligner les difficultés. On objectera sans doute que certaines questions réservent une place exagérée à la théorie. Pourtant il est permis d'hésiter devant la définition d'une solution molaire ou même de ne pas posséder suffisamment les notions d'enthalpie ou d'oxydo-réduction, utilement précisées ici par M. E. Calvet ou M^{lle} J. Yon. Comme cet ouvrage est destiné à la recherche, je n'ai pas hésité à demander à M^{me} M.-Th. Tréfouel un exposé de la question des sulfamides. Il ne s'agit là que d'exemples pris au hasard : tous les collaborateurs qui m'excuseront de ne pouvoir les citer, méritent la même confiance; et je citerai encore l'exposé fondamental de R.-L. Munier et P. Chovin pour la chromatographie.

Avec l'extension des méthodes indispensables à la recherche, la rédaction initiale de l'ouvrage a été considérablement étendue. Néanmoins, l'ouvrage reste très incomplet. Je prie mes collègues, pour qui je rédige ces Techniques, de bien vouloir m'en excuser.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

GÉNÉRALITÉS

I. — PRINCIPES GÉNÉRAUX DES MÉTHODES

DE RECHERCHES ET DE DOSAGES

Le dosage *exact* d'un constituant biologique défini est parfois difficile à réaliser. Tout d'abord les milieux biologiques sont complexes et généralement constitués par des éléments qui ne se prêtent pas à des réactions suffisamment spécifiques pour constituer la base d'un dosage exact. D'autre part, les éléments à doser se trouvent souvent à de faibles concentrations.

Il en résulte, pour chacun des constituants à déterminer dans un milieu biologique, une technique particulière, affectée d'un coefficient d'exactitude variable et basée sur certaines des propriétés physico-chimiques ou chimiques du constituant considéré. Fréquemment, il arrivera, pour les protéides par exemple, que la molécule étudiée sera seulement accessible par ses propriétés physico-chimiques ou par celles qu'elle impose à la solution (solubilité, tension superficielle, valeur des équivalents chimiques, etc.).

Si l'élément à doser répond à une réaction spécifique, il pourra être dosé par une technique exacte (volumétrique ou pondérale).

Parfois cette réaction spécifique échappe à l'une et l'autre de ces méthodes de mesure et se traduit seulement par l'apparition d'une coloration particulière. On compare en ce cas l'intensité de la coloration avec celle d'un étalon. Le dosage perd généralement en précision et n'est valable que dans une certaine zone où l'intensité de la coloration varie proportionnellement à la concentration (exemple : le dosage de la cholestérine par la méthode de Grigaut).

Les techniques du laboratoire se ramènent ainsi soit à des mesures physico-chimiques, soit à des réactions colorées, soit à des dosages volumétriques ou pondéraux.

Réactions colorées. — Le résultat d'une réaction colorée ne peut être enregistré avec certitude qu'à condition de pratiquer simultanément l'épreuve positive et l'épreuve négative.

Une réponse négative peut être due soit à une faute de technique, soit à l'altération des réactifs : aussi sera-t-il toujours prudent de s'assurer, avec les mêmes réactifs, que l'addition de l'élément cherché rend positive la réaction jusque-là négative. Cette précaution devra être de règle pour les recherches délicates, par exemple dans la recherche du sang dans les fèces.

Les collections du laboratoire doivent donc comprendre tous les constituants biologiques dont la détermination peut être recherchée.

Il est utile — surtout quand on ne possède pas une expérience suffisante de la recherche d'un élément — de disposer d'une solution, à titre connu, de cet élément. Une réaction colorée, opérée simultanément sur la solution étalon de cet élément et sur le milieu examiné, peut fixer, par comparaison, l'ordre de grandeur de la quantité de cet élément présente dans le milieu examiné.

II. — APPAREILS GRADUÉS

On emploie des pipettes dont la graduation commence à une petite distance de la pointe, de préférence aux pipettes à écoulement total dont l'emploi est réservé à des cas spéciaux (mesure du sang).

Pour les ballons jaugés, on utilise de préférence des ballons à cols étroits, bouchés à l'émeri, le trait de jauge se trouvant vers le milieu de la partie cylindrique du col.

Les dosages n'ont de sens qu'autant que les pipettes et les vases jaugés utilisés sont rigoureusement exacts, ce qui est rarement le cas des articles commerciaux, et que les liqueurs titrées que l'on emploie sont elles-mêmes l'objet d'un contrôle sévère. On distingue deux catégories de verrerie graduée (*) :

1° Celle qui laisse couler le volume d'eau distillée indiqué entre les deux traits; c'est le cas général pour les pipettes et les burettes;

2° Celle qui contient jusqu'au trait de jauge le volume indiqué d'eau distillée; c'est le cas général pour les flacons jaugés. Il en résulte alors que, pour récupérer quantitativement une solution contenue dans le ballon jaugé, il faut rincer et joindre les eaux de lavage.

La vérification des pipettes et des vases jaugés est la première opération à faire dans un laboratoire. Il n'est point besoin pour cela d'appareils particuliers. L'emploi du mercure n'est pas nécessaire. Il est, d'ailleurs, plus logique de jauger avec un liquide qui mouille le verre. On utilise l'eau distillée et une balance apériodique au 1/10 de mg.

NOTA. — a) Les nombreux dispositifs imaginés pour effectuer le remplissage automatique des burettes, indépendamment de l'encombrement qu'ils réalisent, sont souvent l'origine de causes d'erreur.

b) On ne doit jamais chauffer à une température supérieure à 60° les appareils en verre gradués, la dilatation et le retrait ne se compensant jamais exactement et provoquant par conséquent un changement dans le volume jaugé.

Micro-burettes. — Pour des dosages fréquemment répétés, on utilise la burette à remplissage latéral de 1 à 2 cm³ divisée en 1/100 de cm³, soit

(*) Dans certains appareils d'origine étrangère, ces deux catégories sont distinguées par une lettre gravée sur l'appareil : A (Aussuss) pour la première catégorie, E (Einguss) pour la deuxième.

plus simplement une réduction des burettes ordinaires obtenue à partir d'un long tube capillaire, muni d'un robinet et étalonné au laboratoire. On le remplit et on lave par aspiration de la solution titrée, placée dans un petit verre à pied et présentée à la pointe de la pipette. L'aspiration est réalisée par un tube de caoutchouc que l'on tient à la bouche, l'ascension du liquide étant commandée par l'ouverture ou la fermeture du robinet. Il est bon de protéger la pointe des micro-burettes par un petit manchon de verre entourant l'extrémité inférieure de la burette (fig. 1).

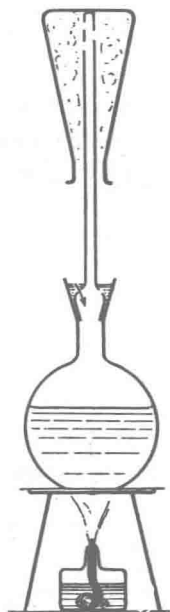


FIG. 2.
Appareil pour le
nettoyage de la
verrerie.



FIG. 1.
Micro-burette à
pointe protégée.

Nettoyage de la verrerie. — Toute la verrerie (tubes à essai, fioles Fourneau, ballons, etc.) doit être nettoyée avec le plus grand soin. Cette recommandation est particulièrement importante pour les microdosages, pour l'étude des phénomènes diastasiques et surtout pour les mesures de tension superficielle. La verrerie est d'abord traitée pendant vingt-quatre heures par le mélange sulfo-chromique, rincée abondamment à l'eau courante, puis à l'eau distillée. On soumet alors la pièce à nettoyer, pendant quelques minutes, à l'action de la vapeur qui a pour effet d'enlever les films superficiels d'impuretés et en même temps d'insolubiliser la couche externe du verre. L'appareil (fig. 2) est constitué par un ballon de 500 cm³ dont le col est terminé par un entonnoir. Le ballon est fermé par un bouchon rodé, percé d'un trou de 2 mm et portant un tube de verre terminé par deux petits orifices et sur lequel on dépose la pièce de verre à nettoyer. Le ballon est rempli d'eau distillée maintenue à l'ébullition. La vapeur se condense sur la pièce de verre en la nettoyant et cette eau de condensation est recueillie par l'entonnoir inférieur d'où elle retourne dans le ballon par le trou percé dans le rodage. Après ce traitement, la verrerie est séchée par un courant d'air.

III. — DÉFINITION DES SOLUTIONS

La teneur d'une solution en soluté peut être définie de plusieurs façons fort différentes :

1^o Par rapport au poids du solvant : on obtient le *titre*. Prenons (*)

(*) DAREIS (E.). — Leçons sur la conductivité des électrolytes. Paris, 1929.

comme exemple 100 g d'une solution obtenue en dissolvant 20 g de NaCl dans 80 g d'eau, le titre est :

$$\frac{20 \times 1\,000}{80} = 250 \text{ g}$$

En exprimant cette valeur en nombre de molécules-grammes pour 1 000 g de solvant, on obtient la *teneur moléculaire* ou *molarité* m. Pour l'exemple précédent :

$$m = \frac{250}{58,5} = 4,28$$

2° Par rapport au volume de la solution : on obtient la *concentration volumétrique* C. Le volume de la solution n'étant pas égal à la somme des volumes du solvant et du soluté, il faut faire intervenir la densité. C'est l'expression utilisée couramment, mais elle présente l'inconvénient de varier avec la température et il faut obligatoirement spécifier la température où l'on opère.

Dans l'exemple précédent ($d = 1,15$) :

$$C = \frac{20}{100} \times 1,15 \times 1\,000 = 230$$

La *molarité* est le nombre de molécules-grammes de soluté par litre de solution. Dans l'application de la loi d'action de masse, les concentrations sont toujours exprimées en molarité.

Les deux exemples précédents mettent en évidence l'importance de la stipulation exacte de la façon où est faite une solution : dissoudre 20 g de NaCl dans 100 cm³ d'eau (ce qui fait 20 g de sel dans 104 cm³ de solution) est une tout autre opération que dissoudre 20 g de sel dans eau Q.S. 100 cm³. La seule notation 20 p. 100 serait donc incorrecte, puisqu'elle laisserait imprécise la concentration de la solution.

3° Pour les calculs théoriques on considère souvent les *fractions moléculaires* (ou *fractions molaires*) : c'est le rapport du nombre de molécules-grammes de soluté au nombre total des molécules-grammes du mélange (soluté et solvant).

Dans l'exemple précédent, 230 g de NaCl correspondent à :

$$\frac{230}{58,5} = 3,93 \text{ molécules-g}$$

Le poids de 1 000 cm³ de solution étant 1 150 g le poids d'eau correspondant est donc :

$$1\,150 - 230 = 920 \text{ g}$$

d'où, pour l'eau :

$$\frac{920}{18} = 51,1 \text{ molécules-g}$$

Le nombre total des molécules est donc 55,03.

On en déduit les fractions molaires :

$$\text{pour NaCl : } \frac{3,93}{55,03} = 0,071 ; \quad \text{pour l'eau : } \frac{51,1}{55,03} = 0,929$$

Plus généralement, si une solution comporte n_1 moles du corps X_1 , n_2 moles du corps X_2 , les fractions molaires sont,

$$\text{pour le corps } X_1 : \quad N_1 = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

$$\text{pour le corps } X_2 : \quad N_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

Il est évident que :

$$N_1 + N_2 + \dots = 1$$

Cette notation en fractions molaires offre l'avantage d'être indépendante de la température.

Volumes molaires apparent et partiel. Soit V le volume total d'une solution constituée par n_2 molécules de solvant et n_1 molécules de soluté. La différence entre le volume de la solution et le volume du solvant pur est $(V - n_2 v_2)$. Le *volume molaire apparent* φ est défini par :

$$\varphi = \frac{V - n_2 v_2}{N_1}$$

Le *volume molaire partiel* est le coefficient différentiel entre le changement de volume de la solution et le nombre des molécules de X_1 :

$$v_1 = \frac{\partial V}{\partial n_1}$$

v_1 peut être positif ou négatif (*).

IV. — LIQUEURS TITRÉES

Préparation et contrôle de l'eau bidistillée. — Toutes les liqueurs titrées doivent être préparées avec de l'eau bidistillée. On observera la plus grande méfiance vis-à-vis de l'eau distillée fournie aux laboratoires. Celle-ci provient en général d'une distillation opérée rapidement dans des appareils semi-industriels, à grand débit ; une telle eau distillée contient

(*) Le volume molaire partiel v_1 peut être déterminé graphiquement. On mesure les volumes V de solution correspondant, pour une quantité constante de solvant, à différentes valeurs de n_1 et on trace la courbe obtenue en portant n_1 en abscisse et V en ordonnées ; v_1 est donné en chaque point par la pente de la courbe.

le plus souvent une quantité notable d'éléments métalliques (Cu, Zn, Sn, Pb). Il est évident que son emploi est impossible pour la micro-analyse, l'étude des phénomènes diastasiques et même pour l'étude des protéines où des complexes métalliques peuvent se former, plus gênants encore que

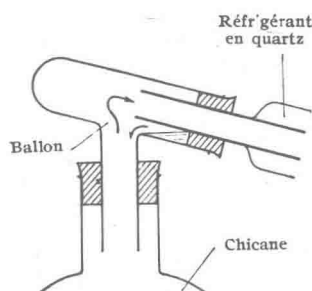


FIG. 3. — Chicane pour la préparation de l'eau bidistillée.

ceux qui auraient pu se former avec de l'eau ordinaire. Dans la suite de cet ouvrage, la mention « eau distillée » se rapportera toujours à une eau bidistillée. L'eau est bidistillée dans un ballon en pyrex muni d'un réfrigérant en quartz. On opère à chauffage modéré de façon à éviter les entraînements vésiculaires. Pour éliminer totalement ces derniers, le réfrigérant est relié au ballon par l'intermédiaire d'une chicane en pyrex (fig. 3), d'où l'eau de condensation reflue dans le ballon. L'usage est d'opérer la distillation en présence d'un peu de permanganate de potassium.

L'eau bidistillée doit être recueillie à l'abri de l'air extérieur.

Le contrôle de l'eau bidistillée doit porter sur la conductibilité, la recherche du cuivre et la mesure du pH (*):

a) La conductibilité doit être de l'ordre de grandeur de 10^{-5} , l'eau devenant suspecte pour une valeur supérieure. La conductibilité de l'eau théoriquement pure est $0,04 \cdot 10^{-6}$, à 18° (Kohlrausch).

b) Le cuivre peut être recherché par la réaction de Kastle-Meyer, Thomas et Carpentier.

On fait bouillir :

Phénolphthaléine	2 g
Potasse pure	20 g
Eau bidistillée	100 cm ³

en présence de 10 g de zinc en poudre jusqu'à décoloration.

Pour l'emploi, on ajoute à 10 cm³ de l'eau à essayer :

IV gouttes de réactif
I goutte d'eau oxygénée à 5 ou 6 volumes

Une eau contenant 10^{-6} g de cuivre donne immédiatement une teinte rose passant au rouge vif en quelques secondes; avec une dilution de 10^{-7} , la teinte apparaît en quinze à vingt secondes, et pour une dilution de 10^{-8} , la réaction n'est obtenue qu'après quelques minutes; elle est très pâle, mais nettement perceptible par comparaison avec un témoin.

c) L'eau bidistillée présente le plus généralement un pH compris entre 5 et 5,5, par suite de la présence de traces de CO₂ (très difficiles à éviter): un pH de 5,5 correspond à la présence de 0,5 mg (par litre) de CO₂ dissout.

NOTA. — 1° Les liqueurs titrées doivent être conservées, à l'obscurité, dans des flacons en verre neutre, munis (sauf indication spéciale), d'un bouchon de verre rodé

(*) CLIQUET (R.), GUILBERT (J.) et PÉNAU (H.). — *Bull. S. Chim. Biol.*, 1933, 15, 1944.

légèrement vaseliné. Pour les prélèvements, on ne doit jamais plonger directement une pipette dans le flacon : on verse dans un petit verre à pied un léger excès de liqueur titrée et c'est dans ce verre que l'on plonge la pipette. A la fin de l'opération, l'excès est rejeté et ne doit pas être réintroduit dans le flacon initial.

2° Par temps chaud, il importe d'agiter le flacon d'une solution titrée de façon à réintroduire dans la solution les gouttes d'eau qui auraient pu se condenser sur la paroi supérieure du flacon en entraînant une variation — parfois notable — du titre de la solution.

Solution normale d'acide sulfurique (*). — 1° MÉTHODE GRAVIMÉTRIQUE. — 28 cm³ d'acide sulfurique concentré, pur, à 66° B, sont versés dans une fiole jaugée de 1 litre contenant 700 à 800 cm³ d'eau distillée. On mélange lentement, en refroidissant et on complète à 1 000 cm³.

On prélève 20 cm³ dans un verre à précipitation, on ajoute 20 cm³ d'eau distillée, 1 cm³ d'acide chlorhydrique et on chauffe vers 100° au bain-marie (B.M.). A la liqueur chaude, on ajoute goutte à goutte et en agitant 10 cm³ de BaCl₂ à 10 p. 100. On laisse reposer une demi-heure sur le B.M. A ce moment, le précipité de sulfate de baryum est déposé. On s'assure que la totalité de SO₄H₂ a été précipitée, en ajoutant 1 goutte BaCl₂. Pendant toute la suite de l'opération, le bécber doit être maintenu au B.M. à température voisine de l'ébullition. On décante la liqueur claire sur un filtre sans cendre préalablement mouillé à l'eau bouillante, on lave le précipité par décantation, à l'eau bouillante, 5 ou 6 fois jusqu'à ce que les eaux de lavage ne précipitent plus par BaCl₂ ni par NO₃Ag (solution à 1 %). On entraîne alors le précipité sur le filtre avec de l'eau bouillante, en détachant ce qui adhère aux parois à l'aide d'un agitateur garni de caoutchouc (caoutchouc en feuille de para pur). Le filtre et son contenu sont séchés à l'étuve à 105°. On porte au four à moufle, chauffé au rouge, un creuset de porcelaine (ou mieux de platine) qu'on laisse ensuite refroidir dans un excitateur pour le tarer. On détache le précipité du filtre en le faisant tomber sur du papier noir glacé. On le recouvre d'un verre de montre ou d'un éentonnoir : on introduit le filtre dans le creuset et on le calcine au moufle jusqu'à combustion complète (cendres blanches). On laisse refroidir le creuset jusqu'à ce qu'il soit tiède, on verse 1 goutte de NO₃H pour éviter la réduction du SO₄Ba, on chauffe avec précaution pour éviter les projections et on évapore complètement. On recommence la même opération avec 11 gouttes de SO₄H₂ concentré.

Finalement on verse le précipité dans le creuset en s'aidant d'un pinceau. On calcine à nouveau dix minutes, on laisse refroidir dans le dessiccateur et on pèse.

La différence entre la première et la deuxième pesée donne le poids P du précipité de SO₄Ba.

Le titre pondéral de la solution en acide sulfurique est :

$$\frac{98 \times 1\,000 \times P}{233,4 \times 20}$$

(*) Dans certains laboratoires, on préfère utiliser, comme étalon, une solution d'acide chlorhydrique titrée par CO₂Na₂ pur, ce dernier plus facile à peser exactement que SO₄Ba.

NOTA. — Après la première pesée, on repasse au four, puis au dessiccateur et l'on opère une deuxième pesée. On recommence ainsi jusqu'à poids constant.

2^o MÉTHODE DE G. BERTRAND. — Une méthode de préparation très simple consiste à distiller un poids exactement déterminé d'un sel ammoniacal en présence d'un excès de soude et à calculer le titre de l'acide d'après la quantité de ce dernier qui est employé à la saturation de l'ammoniaque dégagée. Le sel qui convient le mieux est l'oxalate $C_2O_4(NH_4)_2 + H_2O$ parce qu'il est facile à obtenir pur et qu'il n'est ni efflorescent, ni déliquescent.

On pèse 0,710 g (quantité qui correspond exactement à 10 cm³ d'acide normal) de sel que l'on introduit dans le ballon de l'appareil à distiller avec 150 cm³ d'eau et quelques centimètres cubes de lessive de soude. On distille en recueillant dans une petite quantité d'eau (4 à 5 cm³) très légèrement colorée par 1 goutte d'hélianthine. Il faut éviter un excès d'indicateur qui exigerait pour virer une quantité non négligeable de réactif en diminuant par conséquent la sensibilité du virage.

Aussitôt que l'ammoniaque distille, le liquide devient jaune; on le ramène à la teinte rose primitive en y versant l'acide à titrer contenu dans une burette. Chaque fois que la teinte jaune réapparaît, on ajoute un peu d'acide. Vers la fin de l'opération, lorsqu'il ne reste que très peu d'ammoniaque à distiller, il faut avoir soin de verser l'acide goutte à goutte pour ne pas risquer d'en mettre un excès. Le dosage est terminé lorsque la teinte rose ne varie plus.

Solutions normale et décimale d'acide oxalique. — On fait cristalliser 3 fois l'acide oxalique « pur » du commerce en refroidissant brusquement une solution saturée à chaud contenue dans un ballon. On essore, sur un entonnoir de Buchner, le précipité cristallin et on le sèche à l'air, à poids constant, entre deux feuilles de papier filtre. Cette dessiccation est réalisée complètement en quelques jours.

Liquueur normale. — On pèse 63,06 g d'acide oxalique pur que l'on dissout dans de l'eau distillée. On complète à 1 litre.

Liquueur décimale. — 100 cm³ de la solution précédente sont étendus à 1 000 cm³ par de l'eau bidistillée.

La solution se conserve bien.

Préparation des solutions d'indicateurs colorés. — *Méthyl-orange* (ou hélianthine). Début du virage = 3,2 (rouge); fin du virage = 4,4 (jaune). On l'emploie en solution aqueuse à 0,1 p. 100.

Rouge de méthyle (acide p. diméthylaminoazobenzène-o-carbonique). — Début du virage = 4,2 (rouge); fin du virage = 6,4 (jaune). On le dissout à saturation dans de la soude N/10. On utilise soit une dilution à 0,1 p. 100, soit la solution saturée, cette dernière notamment pour préparer les solutions acide et alcaline $\frac{N}{70}$ utilisées pour le microdosage de l'ammoniaque.

Le rouge de méthyle est très sensible au CO_2 , ce qui exige que le dosage soit effectué à chaud. Toutefois lorsqu'il s'agit d'un dosage d'ammoniaque (Kjeldahl), il importe de refroidir lorsque le virage paraît proche de façon à éviter l'hydrolyse des sels d'ammonium.

Pourpre de bromo-crésol (dibromocrésolsulfone-phtaléine). — Début du virage = 5,3 (jaune); fin du virage = 6,9 (pourpre); 0,1 de matière colorante en poudre est mis en solution dans un peu d'eau (15 cm³ environ) additionnée de la quantité juste suffisante de soude N/20 pour amener le virage. On opère dans un petit vase d'Erlenmeyer et on chauffe. Après dissolution, on étend à 500 cm³ avec de l'eau, de façon à obtenir une solution à 0,02 g p. 100.

Phtaléine du phénol. — Début du virage = 8,3 (incolore) à 9,9 (rouge). On la dissout à 1 p. 100 dans l'alcool à 60 p. 100.

NOTA. — Toutes ces solutions d'indicateurs colorés doivent être préparées avec de l'eau préalablement bouillie et refroidie à l'abri de l'air.

Liqueurs alcalines normale et décijnormale. — On pèse environ 70 g de soude (ou de potasse) à l'alcool (de préférence en bâtons plutôt qu'en pastilles). On la dépose dans un entonnoir et on lave en noyant brusquement le tout dans de l'eau distillée et en retirant aussitôt. On dissout dans 1 litre d'eau distillée (spécialement bouillie et refroidie, bouchée, à l'abri de l'air) ce qui reste des plaques. Cette solution alcaline est ajustée par dilution sur la solution normale d'acide sulfurique, le titrage se faisant à l'ébullition et en présence de phtaléine. A cet effet, on introduit 20 cm³ de solution d'acide titrée dans un bécher en verre de Bohême ou de Pyrex; on ajoute 20 cm³ d'eau distillée et III gouttes de phtaléine. On porte à l'ébullition franche sur un bec Bunsen et on verse, par affusions successives, la solution de soude à titrer, celle-ci étant contenue dans une burette graduée de 20 cm³ divisée en 1/10 de cm³.

Vingt cm³ d'acide titré doivent être neutralisés par 20 cm³ de solution alcaline. Si le volume de solution alcaline versé est inférieur à 20, égal, par exemple, à 19,6 cm³ on étend proportionnellement 980 cm³ de la solution alcaline préparée à 1 000 cm³. Si ce volume est supérieur, ce qui n'arrive pas en opérant comme ci-dessus, il faut ajouter une nouvelle quantité de soude en plaques à la solution alcaline qui vient de se révéler trop diluée.

NOTA. — Pour la préparation des solutions-tampon, on emploie une solution de soude décarbonatée préparée comme suit : on lave rapidement des bâtons de soude. On les dissout à saturation dans de l'eau distillée bouillie et refroidie à l'abri de l'air. On enferme dans un flacon bouché avec un bouchon de caoutchouc lavé à la soude et on laisse déposer pendant trois semaines à la glacière.

Solutions acide et alcaline N/70 au rouge de méthyle. — On part de la solution de soude N/10 précédemment étalonnée. On fait tomber 28,6 cm³ à l'aide d'une burette dans un ballon jaugé de 200 cm³ vérifié.

On y ajoute II gouttes d'une solution saturée de rouge de méthyle dans de la soude N/10 et on complète à 200 cm³ par de l'eau distillée. On obtient ainsi une solution de soude N/70 colorée en jaune renfermant l'indicateur du virage.

Solution acide. — On dilue de la même manière 28,6 cm³ d'une solution d'acide chlorhydrique comme pour la soude N/70 précédente. On ajoute II gouttes de rouge de méthyle qui vire au rouge et on étend à 200 cm³.

2 cm³ de la solution acide versés à la burette dans une fiole de Fourneau, étendus de 4 à 5 cm³ d'eau bidistillée et portés à l'ébullition, doivent être exactement neutralisés (virage du rouge au jaune) par 2 cm³ de soude N/70; 1 cm³ de ces solutions N/70 correspond à 0,0002 g d'azote.

Solution étalon de chlorure de sodium. — Le chlorure de sodium pur du commerce est dissout dans de l'eau distillée bouillante à raison de 430 g par litre d'eau. On filtre bouillant. En refroidissant sous l'eau, on obtient un précipité fin que l'on essore. La poudre cristalline est séchée à 110°.

La solution étalon s'obtient en dissolvant 10 g de chlorure dans de l'eau distillée. On complète à 1 000. La solution se conserve sans altération.

Solutions de nitrate d'argent. — Le nitrate pur est concassé et séché dans le vide sulfurique pendant quarante-huit heures dans la chambre noire. On emploie :

— la solution à 29,065 g (*) qui correspond volume à volume avec la solution, à 10 g par litre, de chlorure de sodium;

— la solution 5,813 dont 10 cm³ correspondent à 2 cm³ de la même solution étalon;

— enfin, la liqueur N/10 (17 g/1 000 cm³) dont 10 cm³ saturent 10 cm³ d'une solution de 5,85 g de NaCl par litre.

Si la solution titrée est destinée exclusivement au dosage de chlorures acides, on ajoute 1 cm³ de NO₃H p. 1 000 pour assurer la conservation.

Solution N/10 de permanganate de potassium. — La solution N/10 de permanganate correspond à 3,16 g de MnO₄K par litre; elle correspond volume à volume à une solution N/10 d'acide oxalique.

On peut utiliser le permanganate pur du commerce. De préférence, on prend le sel recristallisé et séché dans le vide sulfurique. A cet effet, on prépare à chaud une solution à 20 p. 100, on filtre sur coton de verre et on abandonne à la cristallisation. Les cristaux sont égouttés et séchés dans un dessiccateur au vide sulfurique. On pèse 3,30 g que l'on dissout et étend à 1 000 par de l'eau distillée. La solution est conservée pendant trois ou

(*) 29,065 représente la teneur théorique en NO₃Ag, ce qui exige généralement un poids légèrement supérieur du sel cristallisé (le produit commercial « pur » n'ayant que rarement un titre exact). Pour cette raison, il est préférable de préparer la liqueur argentique, non par pesée, mais par titrage sur une solution étalon de NaCl.