

## CONTRIBUTION A LA METHODE DE THIOCHROME

par

Saim SARACOĞLU

(Institut de chimie générale de l'Université d'Ankara)

**Özet:** Tiyokromun ekstraksiyonu için kullanılan muhtelif çözücüler, tiyokrom ekstraktlarının bulanıklıklarına tesir eden faktörler, kullanılmış tiyokrom çözücülerinin yeni tayinler için tekrar kazanılması, tiyokromun sulu kalevide ve izobutanoldeki stabiliteleri, potasium ferisiyanür miktarının tiyokromun bozunmasına tesiri, potasium ferisiyanürün oksidasyon kabiliyetinin kalevi konsantrasyonu ve ışıkla olan münasebetleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

İzobutanol yerine daha yüksek alkoller kullanılabileceği gibi, yerli mahsullerimizden fuzel yağı da tiyokromun çekilmesi için çok elverişli bir çözücüdür. Kullanılmış tiyokrom çözücülerini % 40-50 kalevi ile yıkanıp destillendikten sonra yeni tayinler için tekrar kazanılmış olurlar. Tiyokrom sulu kalevi çözeltide kararsızdır. Bu, kalevi konsantrasyonu ve ışığa maruz kalma müddeti ile artar. Tiyokrom nötral izobutanolde ve karanlıkta çok sebatlıdır, fakat kalevi reaksiyon gösteren izobutanolde ve hihassa ışık inzimamı ederse çabuk bozunur.

Le présent travail est un essai d'examen des solvants pour l'extraction du thiochrome et d'étude des facteurs qui influent sur l'opacité des solutions alcooliques, la formation et la stabilité du thiochrome en utilisant le spectrophotomètre universel Coleman pour mesurer les fluorescences.

1—L'extraction du thiochrome, d'une solution aqueuse alcaline, s'effectue en général à l'aide d'isobutanol [6]. Une étude sur la possibilité d'employer autres moyens d'extraction a été annoncée[2] sans devenir accessible. Le chloroform [4], l'éthanol [9], le n-butanol [11] et l'alcool isoamylique ont été également utilisés.

Les résultats d'un essai d'emploi de différents solvants sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU I

## Différents solvants pour le thiochrome

12,5  $\gamma$  de thiamine dans 0,25 ml de solution sont traités avec 40 ml de NaOH à 2% contenant 80  $\gamma$  de ferricyanure de potassium. 5 ml sont extraits avec 15 ml du solvant. 10 ml de cette solution, clarifiés avec 1 ml d'éthanol absolu, sont mesurés dans le fluorophotomètre ajusté à 80 graduation d'échelle avec une solution de sulfate de quinine de 300  $\gamma$  /L.

Solvant utilisé pour l'extraction du thiochrome	Fluorescence en pourcentage dans le solvant	
	distillé	distillé, lavé avec NaOH à 5 0% et redistillé
Isobutanol	96,5	96,5
n-Butanol	90,6	98,8
Alcool isoamyl.	94,1	96,5
Alcool amyl.n.	61,9	86,6
Alcool amyl.	95,7	100
Huile de fusel	53,2	100
n-Octanol	81,2	80,1
Méthyléthylcétone	23,5	30,7
Dioxanne	71,8	112,5

Pour le dioxanne on a pris l'alcali de 20 % au lieu de 2 %.

L'examen des résultats portés dans le tableau I montre que l'alcool amylique et en particulier l'huile de fusel, un des produits secondaires de notre industrie de sucre, constituent des solvants par excellence pour l'extraction du thiochrome. Il est à remarquer également, qu'un lavement préalable avec l'alcali fort contribue très efficacement à l'amélioration de la fluorescence et que la distillation seule est insuffisante pour la purification des solvants. La manipulation avec les alcools propylique et isopropylique qui sont en eux-mêmes des solvants de très bonne qualité, présente une difficulté, à savoir la formation d'une opacité au contact de l'air par le gaz carbonique, dans la solution qui reste claire après le traitement tant que le flacon de réaction est tenu fermé.

2 — La régénération des solvants utilisés pour l'extraction du thiochrome: Le traitement avec le noir animal [10] n'a pas été trouvé efficace dans le procédé de régénération des solutions isobutanoliques, parce que premièrement l'adsorption du thiochrome par le noir animal n'est pas complète et deuxièmement le noir animal peut céder à la solution alcoolique des matières fluorescentes étrangères.

Le procédé suivant qui fournit des résultats très satisfaisants est proposé pour la régénération des solvants:

Le solvant est purifié par une première distillation, puis traité avec l'alcali de 40-50%, laissé dans un endroit de préférence ensoleillé et distillé de nouveau. Cet ordre de traitement a pour but :

a) de détruire le thiochrome avec l'alcali sous l'influence de la lumière,

b) d'empêcher la coloration du solvant qui a lieu souvent à la suite du traitement avec l'alcali, dérangeant ainsi la fluorescence.

c) de réduire au minimum la fluorescence étrangère qui n'est pas à supprimer par la simple distillation. De cette façon on arrive en général à abaisser les valeurs pour les témoins.

d) d'éliminer les composés acides contenus dans le solvant qui masqueraient la fluorescence du thiochrome (Comparer les deux dernières colonnes du tableau I).

En effet le thiochrome ne montre pas de fluorescence dans un milieu acide. Si on acidifie la solution isobutanolique de thiochrome soit en l'agitant avec une solution d'acide chlorhydrique, soit en y ajoutant de l'éthanol saturé de gaz HCl, la fluorescence s'évanouit. Elle réapparaît par traitement de la solution isobutanolique ainsi acidifiée avec une solution de NaOH.

### 3 — Sur l'opacité des solutions alcooliques :

Quand on agite l'alcool destiné à extraire le thiochrome avec une solution de NaOH, la phase alcoolique, aussitôt après la séparation, ne montre pas une opacité proprement dite. Celle-ci apparaît progressivement pour atteindre une valeur maximum. Les observations suivantes ont été faites sur l'intensité et la ténacité de ce phénomène.

a) Elles diminuent avec la concentration de NaOH.

b) L'augmentation de la concentration des sels neutres entraîne le même effet.

c) Elles augmentent avec le poids moléculaire de l'alcool utilisé. Ainsi l'alcool isopropylique reste pratiquement clair, tandis que l'alcool octylique est très difficilement clarifié par une centrifugation prolongée.

d) La clarification par la centrifugation s'effectue plus rapidement avec les alcools traités préalablement par l'alcali fort et redistillés. D'après E. C. Grob [5] l'opacité des solutions isobutanoliques provient du carbonate de soude qui y est dispersé très finement et formé par le gaz carbonique de l'air. Mais le fait que l'isobutanol agité avec une solution d'acide chlorhydrique montre aussi une opacité qui disparaît à l'addition d'éthanol ou de sulfate de sodium anhydre, donne à penser que le carbonate de soude n'en est pas la cause exclusive.

#### 4 — La stabilité du thiochrome :

Le thiochrome est stable en solution neutre et acide envers la lumière qui le détruit en solution alcaline de  $\text{pH}=9$  [8]. On sait d'autre part qu'il est très rapidement détruit par les rayons U.V.

Le degré de l'action simultanée de la lumière et de l'alcalinité ne paraît pas, selon une communication récente [3], avoir encore été étudié. Les renseignements que l'on trouve dans la littérature sur cette étape importante de la méthode de thiochrome sont plutôt contradictoires [1]. Les résultats obtenus au sujet de l'influence de la lumière diffuse et de l'alcalinité sur l'intensité de la fluorescence permettent de conclure que la stabilité du thiochrome en milieu alcalin décroît rapidement a) avec la concentration de NaOH, b) avec la durée de l'exposition à la lumière diffuse. L'influence de ces deux facteurs est moins prononcée en solution isobutanolique qu'en solution aqueuse.

Il est intéressant de comparer dans la figure 1 les résultats d'essais avec des alcalis à des concentrations différentes et dans l'obscurité et dans la lumière diffuse.

Les figures 2 et 3 donnent ces relations dans l'obscurité seule. On y voit que la courbe I (fig. 3) passe par un maximum et la chute de la courbe II devient de plus en plus prononcée vers les grandes concentra-

tions. Cette allure des courbes ressemble à celle de la figure 6. Le maximum de la fluorescence coïncide à peu près

Comparaison des degrés de destruction de thiochrome, causée à la lumière diffuse et à l'obscurité par les alcalis de différentes concentrations: Les solutions de thiochrome alcalines aqueuses sont préparées en oxydant 25  $\gamma$  de thiamine dans 0,5 ml de solution avec 2,5 mg de  $K_3 Fe (CN)_6$  contenus dans 50 ml de NaOH. Les fluorescences correspondent à 1,25  $\gamma$  de thiamine et sont exprimées en pourcentage du maximum. La plus inclinée de chaque paire de courbes donne la décroissance à la lumière diffuse.

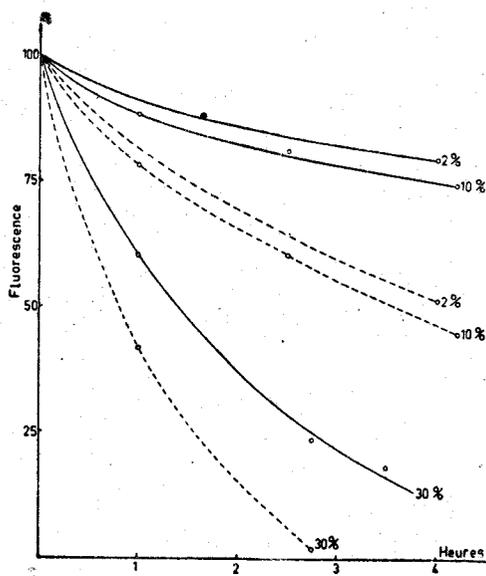


Fig. 1

avec la concentration de l'alcali indiquée par Watson [12] et non avec celle de Otto et Rhümekorb [5] qui ont utilisé une concentration trop forte en ferricyanure de potassium.

La figure 4 montre la décroissance des fluorescences causée par la lumière diffuse des solutions isobutanoliques de thio-

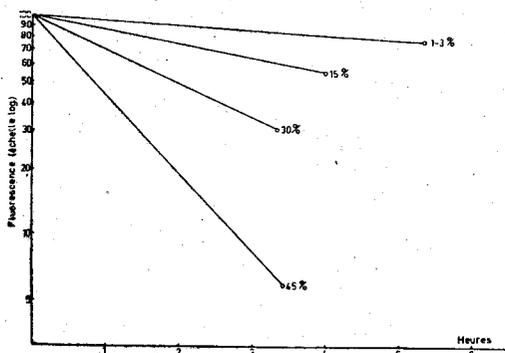


Fig. 2

Influence de la concentration de NaOH sur la destruction du thiochrome protégé contre la lumière en milieu aqueux :

Le thiochrome est préparé comme indiqué précédemment. Les fluorescences sont exprimées en échelle logarithmique comme pourcentage du maximum.

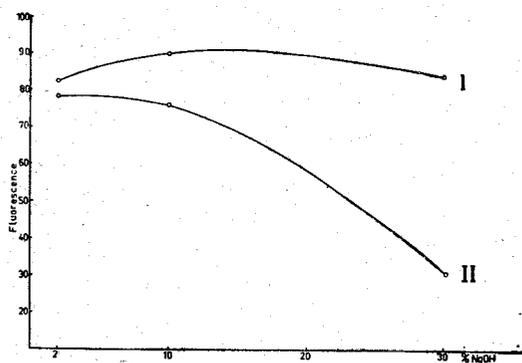


Fig. 3

Influence de la concentration de NaOH sur la destruction du thiochrome protégé contre la lumière en milieu aqueux.

Les solutions de thiochrome alcalines aqueuses sont préparées en oxydant 6  $\gamma$  de thiamine dans 0,12 ml de solution avec 40  $\gamma$  de  $K_3Fe(CN)_6$  contenus dans 20 ml d'une solution de NaOH. Les fluorescences sont les valeurs mesurées sur le fluorophotomètre. La courbe

II exprime les valeurs après 18 heures de séjour dans l'obscurité.

chrome obtenues par traitement avec NaOH de différentes concentrations. L'action seule de l'alcalinité, étudiée en protégeant les solutions contre la lumière, est illustrée par la représentation graphique de la figure 5.

Destruction du thiochrome par la lumière, en milieu isobutanolique, en fonction de l'alcalinité :

Les fluorescences correspondant à 1.5  $\gamma$  de thiamine sont exprimées sur échelle logarithmique en pourcentage. La courbe I est l'isobutanol lavé à l'eau jusqu'à la réaction neutre, la courbe II l'isobutanol agité avec de l'alcali à 10 % et la courbe III l'isobutanol agité avec l'alcali à 20 %.

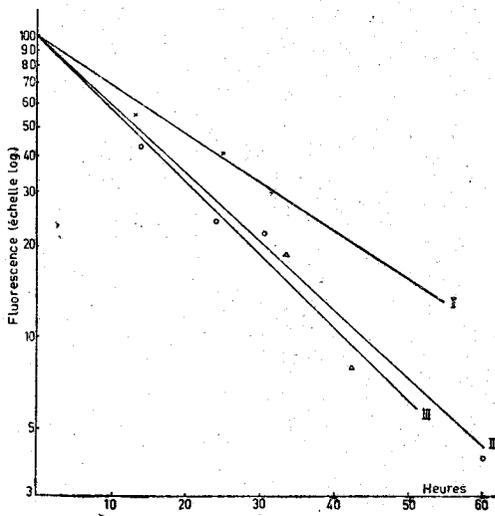


Fig. 4

Dans une solution d'isobutanol neutre obtenue par lavement à l'eau jusqu'à la disparition de la réaction alcaline, le thiochrome est très stable pourvu qu'il soit gardé dans l'obscurité.

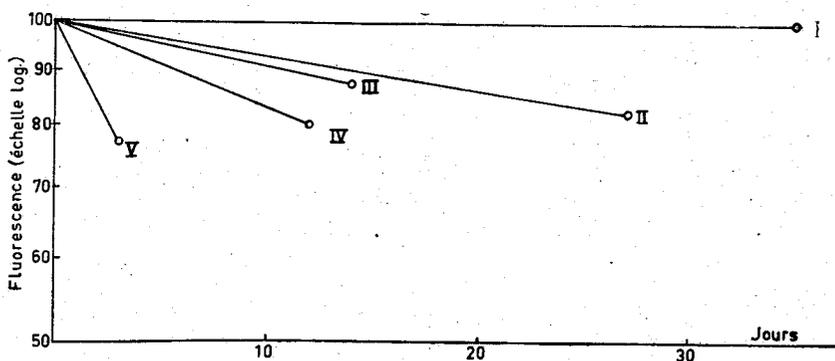


Fig. 5

Destruction du thiochrome en milieu isobutanolique, protégé contre la lumière, en fonction de l'alcalinité:

Les fluorescences correspondent à 1,5  $\gamma$  de thiamine.

Les concentrations de l'alcali utilisé pour la conversion de la thiamine en thiochrome sont respectivement 10 % (II), 20 % (III), 40 % (IV) et 60 % (V). La courbe I est l'isobutanol lavé à l'eau jusqu'à la réaction neutre.

Il faut bien souligner que l'utilisation des flacons bruns ralentit l'effet de la lumière sans pouvoir l'empêcher comme le montre le tableau suivant :

## TABLEAU II

La diminution de la fluorescence suivant les conditions de séjour des solutions isobutanoliques de thiochrome:

15  $\gamma$  de thiamine dans 0,3 ml de solution ont été convertis par 50 ml de NaOH contenant 2,5 mg de ferricyanure de potassium. On extrait 5 ml avec 20 ml d'isobutanol. On ajoute 1 ml d'éthanol à 10 ml d'extrait et on mesure la fluorescence.

A: Séjour dans un flacon incolore sur la table de laboratoire.

B: Séjour dans un flacon brun sur la table de laboratoire.

C: Séjour dans l'obscurité.

Conditions d'illumination	Jours	Fluorescence résiduaire en pourcentage en fonction de concentration de NaOH	
		10 %	30 %
A	7	5,8	2,1
B	9	55,8	50,6
C	20	95,0	88,0

La conséquence pratique est que les solutions de thiochrome dans l'isobutanol peuvent être gardées assez longtemps à l'a-

bri de la lumière sans que l'intensité de la fluorescence soit atteinte pourvu que la concentration de l'alcali employé ne soit pas très forte.

5 — La destruction du thiochrome par le ferricyanure de potassium :

L'influence de la quantité de ferricyanure de potassium a été discutée en considérant les rendements en thiochrome qui doivent dépendre [6] ou non [7] de la quantité de ferricyanure de potassium utilisé. Les deux séries d'expériences exécutées avec de grandes et de petites quantités de ferricyanure de potassium par rapport à la thiamine ont attesté la validité de ces constatations apparemment contradictoires. Les résultats de la première série, résumés dans le tableau III, montrent nettement l'action destructive du ferricyanure de potassium :

TABLEAU III

Influence de grandes quantités de ferricyanure de potassium sur la destruction du thiochrome.

Proportion des quantités		Fluorescence correspondant à 0,83 $\gamma$ de thiamine en pourcentage de maximum	
$\gamma$ thiamine	mg $K_3Fe(CN)_6$ dans 2 % NaOH	mesurée immédiatement	mesurée après un séjour de 4h 1/2 dans l'obscurité
5	0,4	100	76,3
	8,0	88	62,2
	20,0	80	40,4
	80,0	48	4,5

La figure 6 représente graphiquement les résultats des expériences de la deuxième série. La courbe I montre les fluorescences mesurées immédiatement, la courbe II les fluorescences des mêmes solutions après 50 heures de séjour dans l'obscurité. On voit bien que l'augmentation progressive de la quantité du ferricyanure de potassium apporte une chute de plus en plus considérable de la fluorescence (courbe II) bien que le rendement en thiochrome (courbe I), après avoir passé par un maximum, reste pratiquement constant.

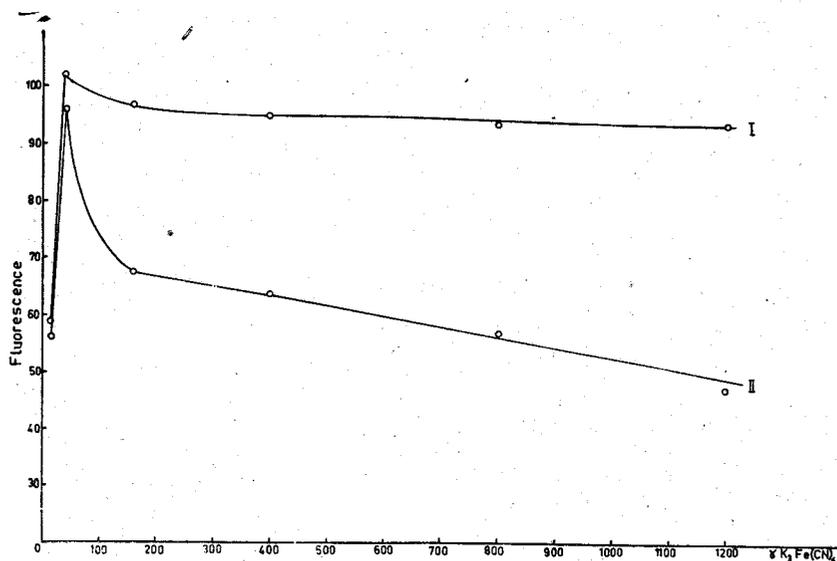


Fig. 6

Influence de la quantité de ferricyanure de potassium sur la destruction du thiochrome :

Les solutions de thiochrome sont préparées en traitant 7,5 γ de thiamine dans 0,15 ml de solution avec 20 ml de NaOH à 2% contenant du ferricyanure de potassium. Les fluorescences correspondent à 1,25 γ de thiamine et expriment les valeurs mesurées sur le fluorophotomètre ajusté à 80 graduation d'échelle avec une solution de sulfate de quinine de 300 γ/L.

6 — Stabilité des solutions alcalines de ferricyanure de potassium :

Les solutions alcalines de ferricyanure de potassium conservent leur efficacité à l'abri de la lumière diffuse si la concentration en NaOH n'est pas très grande. La lumière diffuse anéantit assez vite l'activité de ferricyanure de potassium. Mais dans les conditions des déterminations fluorimétriques cette action de la lumière n'est pas à craindre, parce qu'une période assez longue est nécessaire pour qu'elle soit sensible.

Le tableau IV donne une idée sur la persistance de l'action du ferricyanure de potassium, dépendant ainsi de la concentration de l'alcali et de la quantité de la lumière diffuse.

TEBLEAU IV

Action de la lumière diffuse sur l'effet oxydant du ferricyanure de potassium (5 mg/100) en milieu alcalin aqueux:

Les fluorescences sont obtenues en traitant 5 ml de solution alcaline de  $K_3Fe(CN)_6$  avec 5 ml d'une solution qui contient 1,5  $\gamma$  de thiamine et en extrayant avec 20 ml d'isobutanol dont 10 ml sont ensuite dilués avec 1 ml d'éthanol pour la mesure fluorimétrique.

Heures	Fluorescence comme pourcentage de maximum			
	NaOH à 10 %.		NaOH à 30 %	
	Lumière diffuse	Obscurité	Lumière diffuse	Obscurité
0	100		100	
6	100	100	100	100
9	76	100	0	100
74	0	100	0	42
240	0	100	0	5

## CONCLUSION

L'emploi et la régénération des moyens d'extraction pour le thiochrome autre que l'isobutanol, l'opacité des solutions alcooliques, la stabilité du thiochrome en milieu alcalin et l'effet destructif du ferricyanure de potassium sont discutés. L'huile de fusel constitue un solvant excellent pour le thiochrome. Le traitement des solvants avec de l'alcali fort (40-50%) avant la distillation contribue beaucoup à l'amélioration du procédé fluorimétrique. La stabilité du thiochrome en solution aqueuse décroît rapidement avec l'alcalinité et l'exposition à la lumière. Ces deux facteurs exercent leur influence d'une manière analogue mais beaucoup moins prononcée en solution isobutanolique. L'augmentation de la quantité de ferricyanure de potassium, bien qu'elle n'ait pas d'influence sensible sur le rendement en thiochrome, possède tout de même un effet destructif. La persistance de l'action oxydante du ferricyanure de potassium diminue avec la concentration de l'alcali et la durée de l'exposition à la lumière diffuse.

Je tiens à manifester ma vive reconnaissance à M. le Prof. REHM qui m'a aidé à mettre au point cette communication.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Association of vitamin chemists: Methods of vitamin assay.  
Interscience publishers Ltd. London. 2. Ed. (1951) p. 119.
- [2] Conner R. T. et Straub, G. J., Ind. Eng. Chem.,  
Anal. Ed. 13, 383 (1941).
- [3] De Merre, L. J. et Seibold, M. A., C. A. 46. 1072 (1952).  
[J. Am. Pharm. Assoc. 40, 566 (1951)].
- [4] Flavier, H. et Genevois L., Compt. Rend. Soc. Biol. 130, 497 (1939).
- [5] Gstirner, F., Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden  
4. Aufl. (1951), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, p. 74—75.
- [6] Jansen, B.C.P., Rec. Trav. Chim. 55, 1046 (1936).
- [7] Karrer, W. et Kubli, U., Helv. Chim. Acta 20. 369 (1937).
- [8] Kinnersley, H. W., O'Brien, J. R. et Peters, R. A.  
Biochem. J. 29. 2369 (1935).
- [9] Makoto Hosino, C. 1941. I. 662.  
(J. Pharmac. Soc. Japan 60, 180 (1940).
- [10] Pader, M., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 15. 25 (1943).
- [11] Roth, H., C. 1938. II, 2781 [Biochem. Z. 297, 52 (1938)].
- [12] Watson, H. A., Cereal Chem. 23. 166 (1946).

*(Manuscrit reçu le 25 Novembre 1952)*

Communications de la Faculté des Sciences de  
l'Université d'Ankara

	<u>Page</u>
Mecit OKAY: Studie über Campher und Campheröl von <i>Ocimum kilimandscharicum</i> . . . . .	1
Ertuğrul ONAT and Adolf G. PARTS: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by ferric salts. Part I. The experimental data . . . . .	17
Bahattin BAYSAL: Diradical-Initiated Polymerization Mechanism . . . . .	57
Cemil B. ŞENVAR: Polymerisation of Dissolved Acrylonitrile in the Presence of Ferric Ions and Hydrogene Peroxide Inhibition by Oxygen . . . . .	66
S. AYBAR, C. ŞENVAR und C. AKIN: Über den Einfluss von verschiedenen Anionen, von Rührung, Grösse der Oberfläche und Temperatur auf die durch das Redoxsystem $Fe^{+++} + H_2O_2$ katalysierte Polymerisation von Akrylnitril in wässriger Lösung . . . . .	82
Saim SARACOĞLU: Contribution à la méthode de thiochrome . . . . .	94