

DOSAGE GLOBAL DES GLUCIDES DU SOL PAR LES MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES A L'ANTHRONE ET A L'ORCINOL

par

G. BACHELIER* et R. GAVINELLI**

RÉSUMÉ

Cette notice technique, qui fait suite et complète un précédent article de l'un des auteurs sur les sucres dans le sol, étudie la méthode colorimétrique à l'anthrone et en souligne l'intérêt dans le dosage global des glucides solubles des sols. La comparaison de cette méthode avec la méthode à l'orcinol montre qu'elle est plus simple, plus sensible et plus précise que cette dernière. Les résultats de la méthode à l'anthrone apparaissent en général légèrement supérieurs à ceux obtenus avec la méthode à l'orcinol.

INTRODUCTION.

A la fin d'un précédent article sur les sucres dans le sol (BACHELIER 1966), nous avons envisagé le dosage global des sucres réducteurs solubles du sol et retenu comme plus particulièrement valables pour ce dosage les méthodes colorimétriques à l'orcinol et à l'anthrone. Seule était décrite en détail dans cet article la méthode colorimétrique à l'orcinol, qui nous avait alors servi.

Cette notice technique complémentaire porte sur la méthode colorimétrique à l'anthrone, son application au dosage des glucides solubles des sols, et la comparaison des résultats de cette méthode avec ceux de la méthode à l'orcinol.

* Maître de Recherches ORSTOM S.S.C. Bondy

** Technicien ORSTOM

1. DOSAGE DES GLUCIDES PAR LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE A L'ANTHRONE (1)

Habituellement considérée comme plus classique que la méthode colorimétrique à l'orcinol, la méthode colorimétrique de dosage des glucides par l'anthrone a été conseillée par DREYWOOD en 1946. Étudiée par MORRIS en 1948, elle a depuis été utilisée par de nombreux auteurs, dont notamment BRINK, DUBACH et LYNCH en 1960, GRAVELAND et LYNCH en 1961 et ROUQUEROL en 1965.

L'anthrone, d'après MORRIS, réagit avec tous les oses, diosides et polysaccharides essayés, dont notamment l'amidon et les diverses dextrines. Elle paraît aussi réagir avec les polysaccharides de nombreuses gommes bactériennes. A poids égal, glucose et fructose donnent avec l'anthrone la même réaction colorée. MORRIS a aussi montré que l'anthrone développe pratiquement la même couleur pour un composé sucré ou les produits d'hydrolyse de ce composé ; des poids égaux de glucose (sucre en C 6), de maltose, de saccharose (diosides) et de glycogène (polyosides) donnent à peu de chose près la même couleur, que ces sucres soient ou non hydrolysés au préalable.

Dissoute en milieu sulfurique concentré, l'anthrone apparaît de couleur jaune clair et donne avec les solutions de glucides une coloration bleue, d'où selon la concentration de ces solutions une gamme assez lumineuse allant du vert au bleu-vert. Une certaine fluorescence pourrait apparaître avec les diosanes et une couleur rouge se développer avec les protéines (MORRIS 1948).

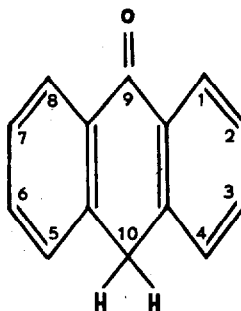
Technique de dosage.

1 g d'anthrone est dissous dans 1 demi-litre d'acide sulfurique à 95 % (acide préparé par addition d'un litre d'acide sulfurique pur à 50 ml d'eau distillée)

5 ml de la solution sucrée à analyser sont placés dans un tube en verre de 25 mm de diamètre, puis recouverts par 10 ml du réactif sulfurique à l'anthrone.

Après agitation tournante du tube pour homogénéisation, ce dernier est placé au moins 10 mn dans un portoir et la couleur qui se développe au cours de l'échauffement du mélange est ensuite mesurée dans un photocolorimètre équipé d'un filtre coloré de 580 m μ (orange) ou 620 m μ (rouge). Un blanc, réalisé avec le réactif et de l'eau distillée, permet le réglage au 0 du photocolorimètre. Une courbe d'étalonnage avec des solutions plus ou moins diluées de glucose est à refaire à chaque série de mesures.

(1) L'anthrone ou "oxo-9 dihydro-10 anthracène" est la forme tautomère de l'anthranol.



Longueur d'onde du filtre coloré.

La figure 1 nous montre les courbes d'étalonnage obtenues avec 4 filtres de longueur d'onde différente. Le filtre 580 m μ (orange) nous a donné la plus grande sensibilité, tout en nous permettant de doser de 0 à 400 gamma de glucose. MORRIS (1948) conseille d'utiliser le filtre 620 m μ (rouge) qui donne une courbe d'étalonnage encore plus inclinée et offre donc une plus grande sensibilité, mais ne permet pas, par suite précisément de la forte inclinaison de cette courbe, de doser plus de 200 gamma de glucose.

Au dessus de 620 m μ , les courbes d'étalonnage remontent rapidement en s'incurvant comme le montre la courbe d'étalonnage établie avec le filtre 650 m μ ; courbe qui confirme celle obtenue par MORRIS avec le filtre 660 m μ .

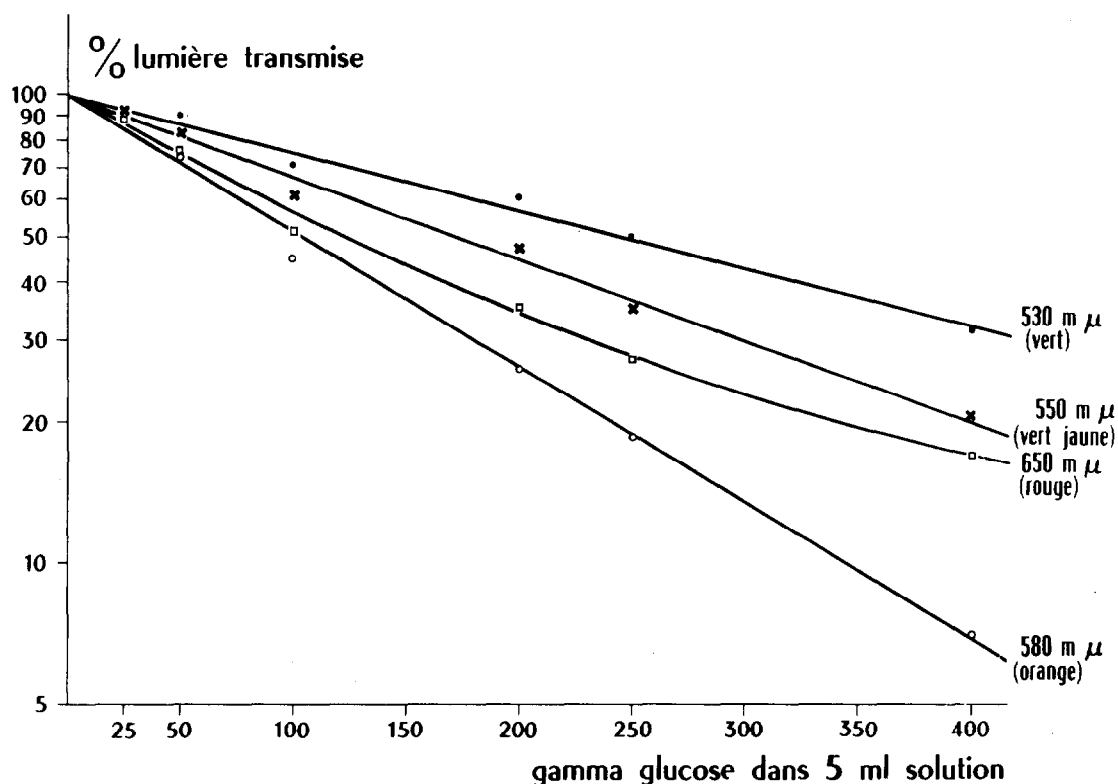


Fig.1 Courbes d'étalonnage à différentes longueurs d'onde

Influence du vieillissement du réactif.

Le réactif sulfurique à l'antrone, au départ de couleur jaune clair, tend, après 4 à 5 heures à la température ambiante et à la lumière, à verdier légèrement, ce qui peut déterminer une inclinaison un peu plus forte de la courbe d'étalonnage. Il est préférable de préparer un réactif frais pour chaque série journalière de dosages, et il est nécessaire de faire une nouvelle courbe d'étalonnage avec chaque nouvelle solution d'antrone et chaque série de dosages.

Diamètre des tubes utilisés pour le développement de la réaction colorée.

La dissipation plus ou moins rapide de la chaleur de réaction, qui se développe quand on ajoute les 10 ml de la solution acide d'anthrone aux 5 ml de la solution aqueuse, a une influence certaine sur le développement de la couleur.

Ainsi, en utilisant des petits béchers de 50 mm de diamètre ou des tubes allongés de 15 mm de diamètre au lieu des tubes de 25 mm de diamètre préconisés (c'est-à-dire, si l'on tend à accroître horizontalement ou verticalement la surface de la solution par rapport à son volume), on obtient des courbes d'étalonnage plus proches de l'horizontale ; le refroidissement trop rapide de la solution doit empêcher le développement complet de la réaction colorée. De même, si après addition du réactif sulfurique à l'anthrone et après homogénéisation, on porte les béchers 10 minutes au bain-marie ou si on laisse les tubes se refroidir dans un portoir en matière plastique isolante, qui les enserre à la base, la réaction colorée tend à se développer davantage et les courbes d'étalonnage à être par conséquent plus inclinées.

Le bain-marie nous semble une complication inutile, mais il nous apparaît par contre nécessaire pour le plein développement de la réaction colorée, d'une part de maintenir les 15 ml de la solution sous un volume le plus sphérique possible (ce qui est réalisé avec les tubes de centrifugeuse, en verre épais, à fond sphérique et de 25 mm de diamètre) et d'autre part d'enfoncer la base de ces tubes dans un portoir en matière plastique isolante de structure spongieuse (plastique de type Sipror, par exemple).

Il est d'ailleurs à noter que ces petites différences dans le plein développement de la réaction colorée ne doivent pas influencer les résultats de dosage, si ces derniers sont conduits dans des conditions strictement identiques à celles adoptées pour l'établissement de leurs courbes d'étalonnage.

Propreté des tubes.

Cette réaction à l'anthrone peut être faussée par une verrerie insuffisamment propre, aussi conseillons-nous de frotter systématiquement au Nab tous les tubes utilisés pour les dosages, en les rinçant ensuite énergiquement à l'eau courante, puis à l'eau distillée, sans surtout les essuyer avec un papier filtre, toute fibre de papier restante causant, comme l'expérience nous l'a prouvé, une erreur importante.

Répétition des dosages.

La répétition des dosages ne montre pas une différence de plus de 4 % entre les divers résultats, soit + ou - 2 % de la valeur moyenne, ainsi que l'avait déjà noté MORRIS (MORRIS 1948).

2. COMPARAISON DU DOSAGE DES GLUCIDES SOLUBLES DES SOLS PAR LES MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES A L'ANTHRONE ET A L'ORCINOL

Utilisant une collection de sols ferrallitiques de l'Adamaoua (Centre-Cameroun) (1), nous en avons extrait les sucres réducteurs solubles, que nous avons ensuite dosés à la fois par la méthode colorimétrique à l'anthrone et la méthode colorimétrique à l'orcinoïol.

(1) Sol ferrallitique typique sur socle, sols ferrallitiques humifères bruns et brun-rouge sur roches volcaniques récentes et sols fortement ferrallitiques rouges sur roches volcaniques anciennes.

La figure 2 nous montre qu'il existe une très bonne corrélation entre les deux séries de résultats ($r = 0,981$ pour 33 échantillons), la méthode à l'anthrone donnant toutefois des résultats légèrement supérieurs à ceux de la méthode à l'orcinoïl ($y = 1,124 x + 0,5$).

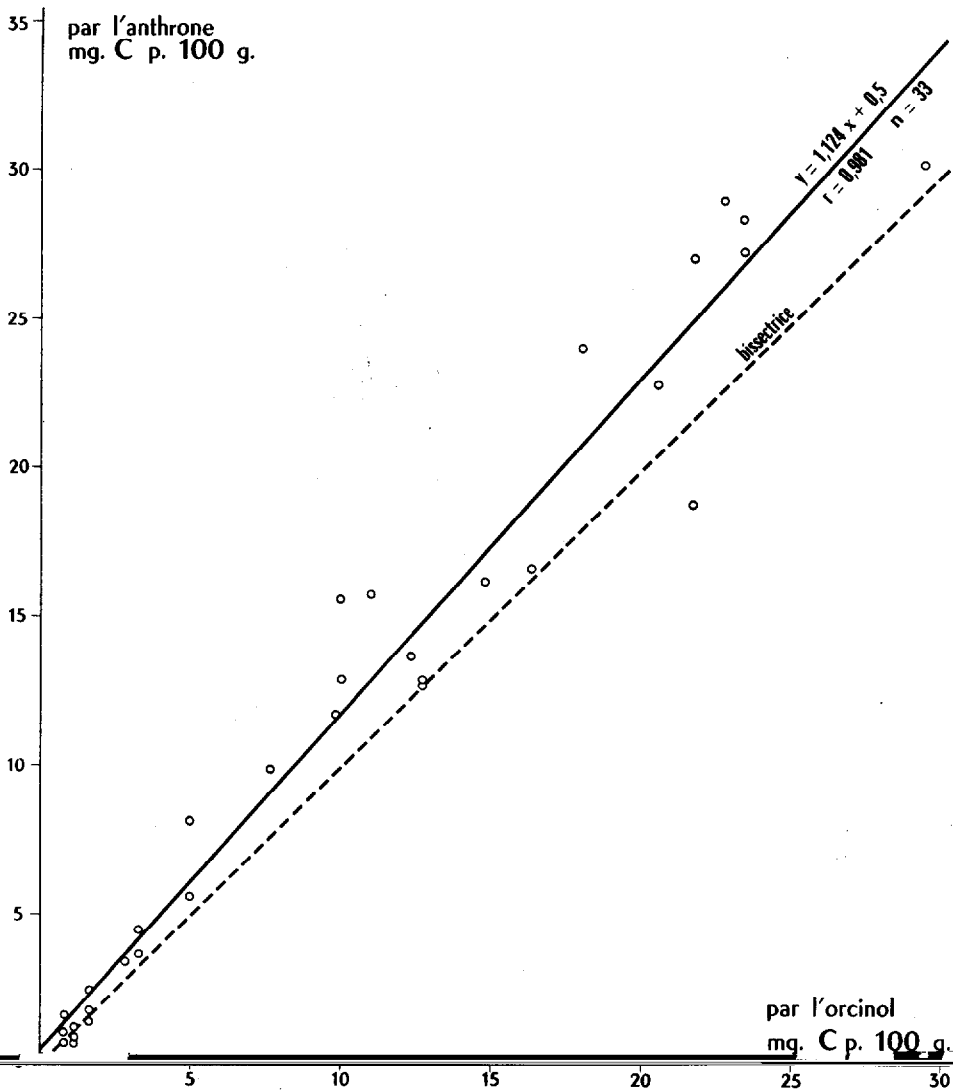


Fig.2 Dosage global des glucides solubles par les méthodes colorimétriques à l'anthrone et à l'orcinoïl dans divers sols de l'Adamaoua (Cameroun)

Extraction et dosage des glucides solubles des sols par la méthode colorimétrique à l'anthrone.

50 g de terre sèche et tamisée à 2 mm (ou un poids équivalent de terre humide dont on connaît l'humidité) sont placés dans une fiole cylindro-conique, que l'on remplit de 300 ml d'eau distillée, que l'on bouche et que l'on porte ensuite au bain-marie à 70° pendant 3 heures et demie avec agitations intermittentes. Pendant l'échauffement à 70° de l'eau des fioles, on débouche plusieurs fois ces dernières pour rétablir leur pression et éviter que leurs bouchons ne sautent.

Après une nuit de repos au frigidaire, on en centrifuge le contenu 10 minutes à 2500 tours-minute. On filtre

la fraction liquide ainsi obtenue, et 100 ml de la solution centrifugée et filtrée sont additionnés d'1 ml de H_2SO_4 au 1/2 (qu'il ne faudra pas oublier dans les calculs), puis, après agitation, abandonnés une nuit au frigidaire.

5 ml de cette solution sont titrés le lendemain selon la technique de dosage exposée plus haut.

Rappel de la technique d'extraction et de dosage des glucides solubles des sols par la méthode colorimétrique à l'orcinol.

L'extraction des glucides solubles s'effectue de la même manière, mais avec 60 g de terre pour 300 ml d'eau distillée. De plus, après le bain-marie (3 h 1/2 à 70°), la nuit de repos au frigidaire, la centrifugation à 2500 tours-minute et la filtration, il est nécessaire d'effectuer une concentration de la solution.

Pour cela, 150 ml de la solution centrifugée et filtrée sont additionnés d'1 ml d' H_2SO_4 au 1/2, puis réduits sur plaque chauffante et sans ébullition à environ 20 ml. Après refroidissement, ces 20 ml sont ajustés à 25 ml (ou 50 ml, ou même encore plus, si l'on a des échantillons très organiques).

~~Après filtration sur leirs de verre de la solution ajustée, 1 ml du filtrat est additionné de 10 ml d'une solution sulfurique 66 % en volume (552 ml H_2SO_4 , $d = 1,83$ amenés à 1 000 ml) et à 0,2 % d'orcinol. Après homogénéisation du mélange, on porte ce dernier au bain-marie bouillant pendant 12 minutes. On laisse refroidir et on ajuste à 50 ml. Après nouveau refroidissement, le dosage est réalisé à l'aide du colorimètre et disque colorimétrique Lovibond gradué directement en millièmes de mg de glucose pour 10 ml de solution (il convient donc de multiplier par 5 les résultats pour les ramener à 50 ml).~~

Si la solution s'avère trop concentrée et dépasse la valeur maxima de graduation du disque colorimétrique Lovibond, on a rapidement formation d'un précipité brun-rouge ; il faut alors diluer la solution d'extraction, en reprendre 1 ml et porter à son tour ce nouveau ml au bain-marie bouillant, après addition de 10 ml de la solution d'orcinol. Les valeurs élevées de la graduation du disque doivent être contrôlées par une dilution au 1/2 de la solution de dosage.

CONCLUSIONS

Les méthodes colorimétriques à l'anthrone et à l'orcinol permettent de doser facilement les glucides solubles des sols et leurs résultats se recoupent, encore que ceux de la méthode à l'anthrone soient généralement un peu supérieurs à ceux de la méthode à l'orcinol.

La méthode colorimétrique à l'anthrone est plus rapide que la méthode colorimétrique à l'orcinol, cette dernière nécessitant en effet une concentration de la solution d'extraction, plusieurs ajustements de volume et un passage au bain-marie supplémentaires. La méthode à l'anthrone réclame toutefois une gamme d'étalonnage avec chaque série de dosages, et la possession d'un photolorimètre à filtre approprié (580 à 600 m μ).

Partant d'un poids de terre légèrement inférieur et ne nécessitant pas la concentration de la solution d'extraction des glucides solubles, la méthode à l'anthrone apparaît plus sensible que celle à l'orcinol. Ses résultats sont aussi plus précis puisqu'estimés à $\pm 2\%$, alors que ceux de la méthode à l'orcinol le sont à $\pm 5\%$.

BIBLIOGRAPHIE

BACHELIER (G.), 1966.- Les sucres dans le sol et leur dosage global. Cah. ORSTOM. sér. Pédol., IV, 1

BRINK (R.H.), DUBACH (Jr.P.), LYNCH (D.L.), 1960.- Measurement of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. Soil Sci., mars 1960, 89, 3, 157-166.

DREYWOOD (R.), 1946.- Qualitative test for carbohydrate material.
Ind. Eng. Che. (Anal. ed.), 18, 8, 499.

GRAVELAND (D.N.), LYNCH (D.L.), 1961.- Distribution of carbohydrates in soil hydrolyzates of a soil catena. Soil Sci., 71, 6, 102-103.

MORRIS (D.L.), 1948.- Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent.
Science, 5 mars 1948, 107, 254-255.

ROUQUEROL (T.), 1965.- Recherche des glucides libres dans le sol.
Biol. du sol (Bull. de l'Ass. Int. Sci. du Sol), 4, 18-20.