

P. HANOVER

**MÉTHODES D'ANALYSES**  
**utilisées au Laboratoire**  
**des Glucides**  
**C.S.T. BONDY**



OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ET TECHNIQUE OUTRE-MER



OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

OUTRE-MER

CENTRE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

DE BONDY

METHODES D'ANALYSES UTILISEES AU  
LABORATOIRE DES GLUCIDES

Année 1963 - 1964

## FIXATION ET EXTRACTION DES GLUCIDES DANS LES VEGETAUX.

Dès la récolte, le matériel végétal, très altérable, doit être stabilisé.

### Récolte et stabilisation de la matière végétale pour le dosage des glucides.

Les différentes parties des plantes à analyser seront récoltées, lavées à l'eau distillée, séchées au papier Joseph, puis pesées le plus rapidement possible. Il est nécessaire de déterminer, en même temps que le prélèvement pour la fixation alcoolique, l'humidité de chaque échantillon.

La fixation s'effectue de préférence dans un erlenmeyer à large ouverture.

Dans un erlenmeyer muni d'un réfrigérant ascendant et placé dans un bain-marie, mettre de l'alcool à 95° plus 1 g. environ de  $\text{CO}_3 \text{Ca}$  par litre d'éthanol. Porter à l'ébullition.

Si l'échantillon à stabiliser est peu important, le projeter directement dans l'alcool bouillant.

Si l'échantillon est copieux, donc peu maniable, remplir un erlenmeyer (sans alcool) avec le matériel végétal et vider l'alcool bouillant sur l'échantillon.

Dans les 2 cas, maintenir l'ébullition pendant 10 à 15 minutes suivant les organes à stabiliser.

La quantité d'éthanol doit être égale à environ 5 fois le poids du matériel végétal à fixer.

L'addition de  $\text{CO}_3 \text{Ca}$  a pour but de neutraliser une acidité éventuelle du milieu.

Ce traitement détruit les enzymes, sans altérer les glucides. Le matériel végétal peut être conservé dans l'alcool de fixation, en flacon bouché et à l'abri de la lumière pendant plusieurs mois.

Différents modes de préparation de la banane  
en vu de l'analyse des glucides

	Sucres totaux % MS	Sucres réducteurs % MS	Sucres hydro- lysables % MS	Amidon % MS
Fixation par l'éthanol bouillant en présence de CO <sub>2</sub> CA	60,91	9,37	51,54	16,03
Extraction immédiate par H <sub>2</sub> O à 40° C	60,20	19,13	41,07	15,13
Séchage sous vide 35°C Extraction H <sub>2</sub> O à 40° C	52,24	41,65	11,59	16,08
Séchage sous vide à 60°C - Extraction H <sub>2</sub> O à 40°C	52,16	47,51	4,64	12,92

Tableau d'une expérience réalisée au laboratoire des glucides sur un même échantillon, montrant l'importance de la fixation du matériel végétal. On voit que seul l'alcool bouillant additionné de carbonate empêche l'hydrolyse des sucres de la banane.

Extraction des glucides solubles d'un matériel végétal stabilisé par l'éthanol

Décapter l'alcool de fixation sur un filtre plissé taré, au dessus d'un ballon de 1 ou 2 litres suivant l'abondance de l'échantillon. Cet alcool contient une partie des glucides solubles.

Broyer le plus finement possible les organes végétaux au mixer, puis faire une extraction par l'alcool à 70-80°.

Pour cela placer l'échantillon finement broyé dans un erlenmeyer muni d'un réfrigérant ascendant, en présence d'une quantité d'alcool 70-80° suffisante.

On porte alors à l'ébullition pendant 15 minutes.

Filtrer et joindre au 1er filtrat.

Traiter une seconde fois par l'alcool à 70 - 80° et comme précédemment, filtrer et joindre ce 3ème filtrat aux deux premiers.

On utilise un alcool 70 - 80° car certains sucres sont peu solubles dans l'alcool à 95°. D'autre part, un alcool de titre inférieur à 70° risquerait d'entraîner certains glucides insolubles dans l'alcool.

Conserver les tissus épuisés qui contiennent l'amidon et les insolubles dans l'alcool.

#### Préparation de l'alcool 70 - 80°.

Ajouter à 760 ml d'alcool éthylique à 95°, 240 ml d'eau distillée, bien mélanger avant l'emploi.

#### Traitement de l'extrait alcoolique.

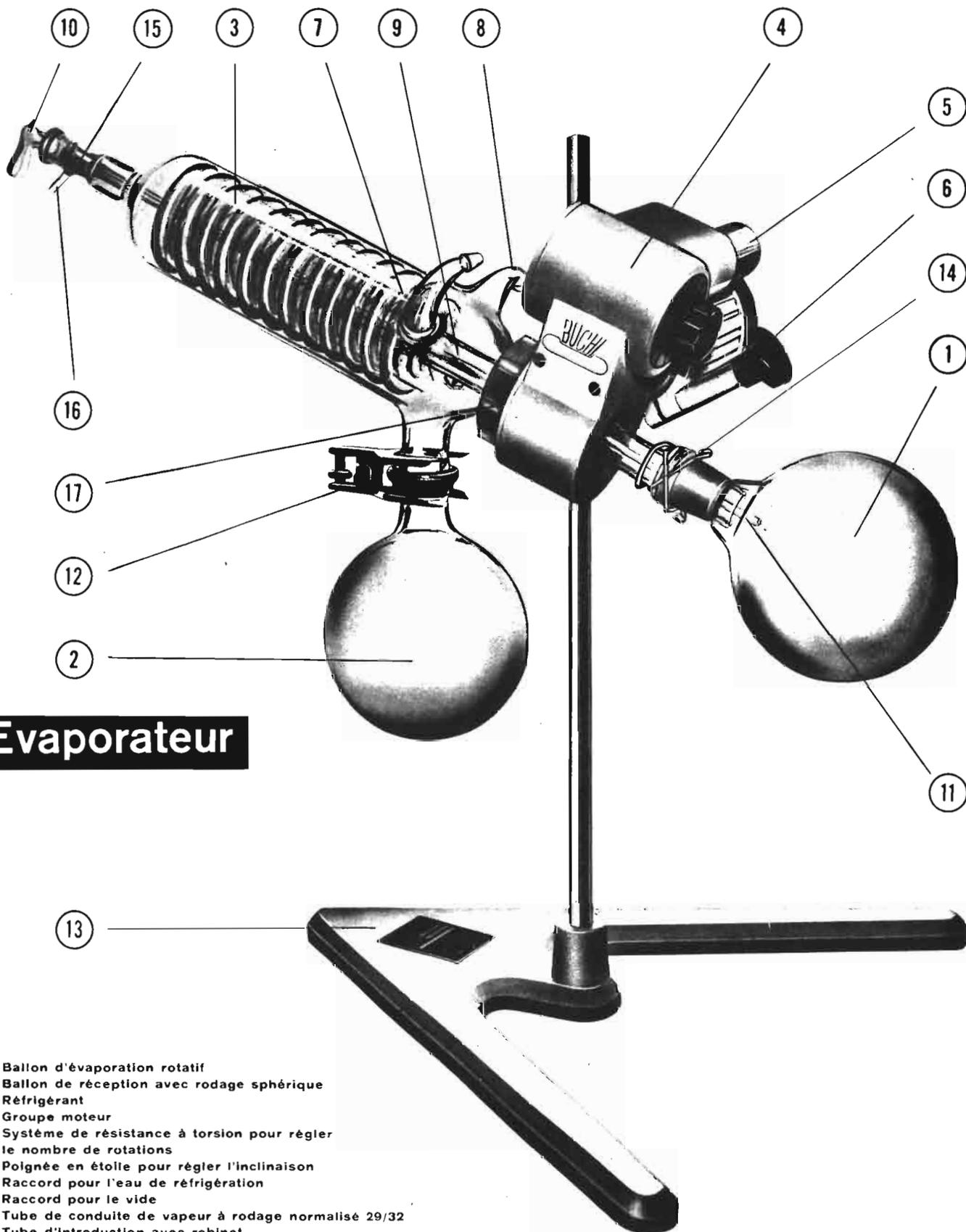
Cet extrait contient tous les holosides sauf l'amidon et également des hétérosides.

Distiller l'alcool sous pression réduite à une température ne dépassant pas 50° C, à l'aide d'un distillateur sous vide, rotatif.

#### Emploi d'un évaporateur rotatif sous vide.

- Dans un ballon de 0,5, 1 ou 2 litres, rempli aux 2/3 du liquide à évaporer, ajouter une douzaine de billes de verre de Ø 3 à 5 mm, pour régulariser l'ébullition ultérieure. Ne jamais dépasser, pour le remplissage du ballon, les 2/3 de sa capacité.
- Fixer le ballon rodé sur l'évaporateur rotatif.
- Mettre le vide pour coller le rodage.
- Puis seulement, démarrer la rotation du ballon.
- S'assurer de la bonne marche de la réfrigération.

Le début de la distillation doit se faire à 30° C à 35° C avec un vide de 73 cm Hg. Si l'ébullition a tendance au départ à s'emballer, cesser légèrement le vide à l'aide du robinet placé à cet effet sur l'appareil. Augmenter ensuite progressivement la température de la distillation jusqu'à 45° C, mais ne jamais dépasser 50° C.



# Evaporateur

- 1 Ballon d'évaporation rotatif
- 2 Ballon de réception avec rodage sphérique
- 3 Réfrigérant
- 4 Groupe moteur
- 5 Système de résistance à torsion pour régler le nombre de rotations
- 6 Poignée en étoile pour régler l'inclinaison
- 7 Raccord pour l'eau de réfrigération
- 8 Raccord pour le vide
- 9 Tube de conduite de vapeur à rodage normalisé 29/32
- 10 Tube d'introduction avec robinet
- 11 Extrémité inférieure du tube d'introduction
- 12 Pince métallique No. 35 pour rodage sphérique
- 13 Pied de statif avec barre
- 14 Pince pour rodage normalisé
- 15 Alésage d'aération
- 16 Raccord pour connexion de tuyaux flexibles
- 17 Raccord à vis pour fixation du réfrigérant
- 18 Joint en GACO ou autre matériel convenable

La distillation de l'alcool est terminée lorsqu'apparaissent des gouttelettes de vapeur d'eau sur le tube de garde. L'on peut poursuivre la concentration du liquide si le résidu aqueux est trop important.

Pour arrêter l'appareil, procéder de la façon suivante :

- Arrêter la rotation du ballon,
- Faire entrer l'air lentement dans l'appareil,
- Démonter le ballon contenant le résidu aqueux.

- Verser le résidu aqueux (5 ml à 50 ml) de la distillation dans une éprouvette graduée bouchée émeri ou une fiole jaugée suivant le cas. Rincer le ballon avec de l'eau distillée tiède (50° C au maximum) par petites quantités, de nombreuses fois. Ce liquide sera la solution A.

Nota : Pour 50 g. de matière végétale fixée, il ne faut pas dépasser 100 à 120 ml de solution.

#### Défécation de la solution aqueuse.

L'extrait aqueux initial (Solution A) est chargé de nombreuses substances (glucides, graisses et lipoides, pigments, acides aminés, acides organiques, sels minéraux, des corps réducteurs qui ne sont pas des glucides, etc...).

Ces substances risquent de perturber le dosage chimique ainsi que la chromatographie sur papier des glucides. Il faut donc préalablement les éliminer. C'est le but de la défécation.

#### Préparation des réactifs.

##### - Sulfate de zinc à 4 %.

- Dissoudre 40 g. de  $SO_4 Zn$  dans 1000 ml  $H_2 O$  distillée.

##### - Baryte hydratée à 5 %.

- Faire bouillir 1 litre d'eau distillée 30 minutes.

- Ajouter progressivement 50 g. de baryte dans l'eau bouillante.

- Agiter et filtrer sur filtre plissé.

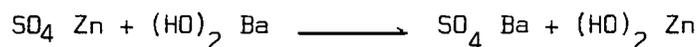
- Laisser refroidir à l'abri de l'air.

- Décanter et filtrer de nouveau si nécessaire.

Pour conserver  $(OH)_2 Ba$  &  $H_2 O$  non carbonatée, il faut que la solution se trouve à l'abri du  $CO_2$  de l'air.

#### Défécation.

La défécation se fait à froid au moyen de sulfate de zinc et de baryte. La quantité de mélange à ajouter dépend de la nature du matériel végétal.



On compte en général 30 ml de  $SO_4 Zn$  et 45 ml  $(HO)_2 Ba$  pour 75 g. de matériel végétal. Utiliser toujours les proportions 2 :  $SO_4 Zn$  3 :  $(HO)_2 Ba$ . le liquide surnageant doit être limpide et de pH voisin de 4,5.

Ajouter d'abord  $SO_4 Zn$  puis  $(HO)_2 Ba$  à la solution initiale A. Volumer dans une éprouvette graduée bouchée émeri ou une fiole jaugée suivant le cas, puis centrifuger.

Le liquide obtenu est la solution B qui sert aux dosages et à la chromatographie des sucres.

#### Délipidation.

Lorsque des échantillons contiennent beaucoup d'huile ou de graisse, il est parfois nécessaire de délipider le résidu aqueux.

- A cet effet, on rince le ballon alternativement avec 5 ml d'hexane et 5 ml d'eau distillée tiède. On ajoute chaque portion au fur et à mesure dans une ampoule à décanter.

- Agiter plusieurs fois puis laisser reposer. Lorsque la séparation des deux liquides est nette, on soutire l'eau qui contient les sucres.

- Faire plusieurs décantations en rajoutant à chaque fois 10 ml d'eau distillée.

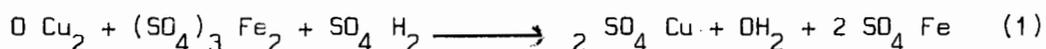
Si la solution était trop diluée à la suite de ce traitement, la concentrer à l'évaporateur rotatif, puis continuer la préparation normale.

#### Dosages des glucides dans les végétaux par la méthode de G. BERTRAND.

##### Principe :

On emploie une solution alcaline d'oxyde de cuivre dont on fait bouillir un excès avec un volume connu de la solution du sucre à doser. L'oxyde cuivreux

ou oxydure ( $O\ Cu_2$ ) précipité est dosé volumétriquement à l'aide de la méthode de Mohr. L'oxydure est traité par une solution acide de sulfate ferrique.  $O\ Cu_2$  se dissout à l'état de  $SO_4\ Cu$ , tandis qu'une proportion correspondante de sel ferrique passe à l'état de sel ferreux.



On dose ce dernier au permanganate de potassium. On calcule la quantité de Cu qui a été précipitée par le sucre en s'appuyant sur l'équation ci-dessus.

#### Préparation des réactifs.

##### - Liquueur cuivrique :

- Broyer finement 40 g de sulfate de cuivre ( $SO_4\ Cu, 5\ H_2\ O$ ).
- Mettre dans un bécher avec de l'eau distillée.
- Agiter de temps en temps jusqu'à dissolution complète.
- Mettre dans une fiole jaugée. Compléter à 1000 ml.

##### - Liquueur sodique :

- Mettre 150 g. de soude dans un bécher de 1 litre.
- Ajouter un peu d'eau distillée.
- Agiter jusqu'à dissolution complète de la soude.
- Ajouter 200 g. de sel de Seignette ( $C_4\ H_4\ O_6\ K\ Na, 4\ H_2\ O$ ). Agiter de temps en temps.
- Ne mettre dans une fiole jaugée qu'après dissolution complète.
- Volumer   1000 ml.

##### - Liquueur ferrique.

- Mettre 50 g. de sulfate ferrique ( $(SO_4)_3\ Fe_2$ ) dans un bécher de 1 litre.
- Ajouter un peu d'eau distillée. Agiter.
- Verser 109 ml d'acide sulfurique à 96 % avec précautions.
- Agiter. Mettre de l'eau distillée jusqu'aux 2/3 du bécher.

- Agiter de nouveau de temps en temps. Jauger après dissolution complète du sel (Un jour et une nuit au minimum).

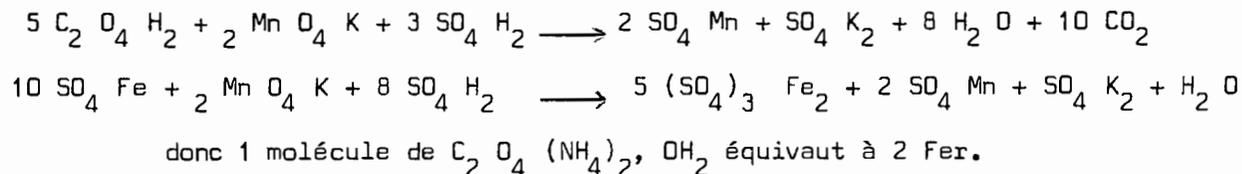
- Oxalate d'ammonium cristallisé.

Sert à doser le permanganate de potassium.

Faire plusieurs pesées à la balance de précision de 250 mg de  $C_2 O_4 (NH_4)_2, OH_2$ .

- Solution titrée de  $Mn O_4 K$  à 5 ‰.

- Peser 5 g. de  $Mn O_4 K$ .
- Faire bouillir 10 minutes de l'eau distillée dans un erlenmeyer.
- Boucher l'erlenmeyer et laisser légèrement refroidir.
- Mettre les 5 g. de  $Mn O_4 K$  dans cette eau. Laisser refroidir à l'abri de l'air et de la lumière. Agiter de temps en temps.
- Transvaser dans une fiole jaugée de 1 litre. Rincer l'erlenmeyer avec de l'eau distillée bouillie froide. Ajuster. Transvaser dans un flacon brun.
- Titrer seulement après 4 à 5 jours après avoir filtré la solution sur verre fritté G 4.
- Pour le titrage, peser exactement 250 mg d'oxalate d' $NH_4$ . L'ammoniaque du sel n'intervient pas, mais seulement la fonction oxalique.



D'après la réaction (1)  $2 Fe = 2 Cu$

$$142,12 \longrightarrow 2 \times 55,85 \longrightarrow 2 \times 63,54$$

$$250 \times \frac{63,54}{142,12} \times 2 = 250 \times 0,89417 = 223,5425$$

↑  
Poids d'oxalate 142,12

Exemple :  $C_2 O_4 (NH_4)_2, OH_2$  : 250 mg

$Mn O_4 K$  env. 5‰  $\longrightarrow$  22,5 ml

$\frac{223,5425}{22,5} = 9,935$  mg de Cu pour 1 ml de  $Mn O_4 K$ .

Le permanganate N/10 peut aussi servir au dosage des sucres. Les tables correspondantes utilisées pour cette concentration se trouvent dans le tome III du BRUNEL.

### DOSAGES DES SUCRES

#### 1°/ Sucres réducteurs.

- Prendre 20 ml de la solution B dans un erlenmeyer de 200 ml.
- Ajouter 20 ml de liqueur cuivrique.
- Puis 20 ml de la liqueur sodique, dans cet ordre et en agitant continuellement.

Si la soude était seule, elle décomposerait le sulfate de cuivre en donnant un précipité d'hydrate.



Mais en présence d'acide tartrique, il n'y a plus de précipité. On obtient une liqueur bleue foncée.

- Porter à l'ébullition pendant 3 minutes exactement.
- Retirer du feu. Laisser déposer le précipité de  $O Cu_2$  au fond de l'erlenmeyer en inclinant celui-ci sur un volet. (Le précipité colmate rapidement le filtre s'il passe dans le tube d'Allihn).
- Filtrer le liquide surnageant dans un tube d'Allihn de porosité 4, placé sur une fiole à vide de 250 ml. La couleur de ce liquide doit être franchement bleue, indiquant un excès de cuivre. S'il en était autrement, recommencer en diluant la solution B (Prendre 10 ml de cette solution et ajouter 10 ml d'eau distillée).
- Laver le précipité resté dans l'erlenmeyer avec de l'eau distillée bouillante. Laisser décanter et filtrer.

Le précipité d'oxydure ne doit jamais rester au contact de l'air sur le filtre comme dans l'erlenmeyer.  $O\ Cu_2$  se transforme facilement en  $O\ Cu$ .

Cesser de faire le vide quand il reste encore  $\frac{1}{2}$  cm de liquide sur le filtre.

- Verser la solution ferrique, en quantité suffisante (5, 10, 20 ml) dans l'erlenmeyer contenant l'oxydure. Celui-ci se dissout en passant du rouge au bleu noir, puis donne une solution limpide de couleur verte.
- Passer cette solution dans le tube d'Allihn pour dissoudre le précipité retenu au moment de la première filtration.
- Rincer l'erlenmeyer et le filtre 2 fois à l'eau distillée bouillante, en joignant au liquide précédent.
- Titrer avec  $Mn\ O_4\ K\ 5\ \text{‰}$  à chaud.

Le virage est extrêmement net. Une goutte de  $Mn\ O_4\ K$  en excès fait passer la solution du vert au rose.

Calculs :

Si la solution B = 200 ml et 1 ml  $Mn\ O_4\ K\ 5\ \text{‰}$  = 9,935 de Cu.

Prise de B = 20 ml

$Mn\ O_4\ K$  versé pour le dosage 12,5 ml

$9,935 \times 12,5 = 124\ \text{mg},187\ \text{Cu}$  dans les 20 ml de B

Dans le tableau de correspondance  $124,7\ \text{mg}$  de Cu =  $67\ \text{mg}$  de sucre pour

$124,187 : \frac{67 \times 124,187}{124,7} = 66,7\ \text{mg}$  de sucre dans les 20 ml de la solution.

Dans la solution B  $\frac{66,7 \times 200}{20} = 667\ \text{mg}$  de sucres réducteurs.

Ce résultat est calculé en glucose et doit être rapporté au poids sec du matériel végétal analysé.

2°/ Sucres totaux.

- Prendre 20 ml de la solution B, les mettre dans une fiole de 25 ml.
- Ajouter  $\frac{1}{2}$  ml de ClH au  $\frac{1}{2}$ .

- Porter au bain-marie bouillant 15 minutes.

La quantité d'acide à ajouter pour l'hydrolyse ainsi que le temps au bain-marie dépendent de la nature des sucres dosés. Les chiffres donnés sont en général satisfaisants. Si les résultats n'étaient pas constants, essayer d'autres concentrations en ClH ou faire varier le temps d'hydrolyse.

- Laisser refroidir. Neutraliser avec HO Na N jusqu'à pH 6, contrôler le pH au papier universel. Ajuster à 25 ml avec de l'eau distillée.
- Prélever 20 ml de la solution. Mettre dans un erlenmeyer de 200-250 ml. Opérer comme pour les sucres réducteurs.

Calculs :

On dose ici les sucres totaux (sucres réducteurs + sucres hydrolysables).

Prise de B. 20 ml amenés à 25 ml puis prélèvement de 20 ml, soit l'équivalent de 16 ml de la solution B.

Si on a utilisé pour le second dosage 17 ml de  $MnO_4$  K 5 ‰, 12,5 ml étant le volume versé pour le dosage des sucres réducteurs, il reste  $17 - 12,5 = 4,5$  ml correspondant aux sucres hydrolysés.

$$9,935 \times 4,5 = 44,707 \text{ mg de Cu dans la prise d'essai de B.}$$

Dans le tableau de correspondance du sucre interverti 44,2 mg de Cu = 22mg de sucre.

$$\frac{22 \times 44,707}{44,2} = 22,2 \text{ mg de sucre interverti dans la prise d'essai.}$$

$$22,2 \times 200 = 277 \text{ mg de sucres hydrolysés dans la solution B}$$

16

Les résultats doivent être rapportés au poids sec du matériel végétal analysé.

#### Tables de Gabriel Bertrand.

Les tables de G. Bertrand ont été établies pour des concentrations en sucres de 10 à 100 mg dans une prise de 20 ml. Diluer la prise si la solution est trop concentrée. Employer une microméthode pour les concentrations inférieures.

La concentration cuivrique et l'alcalinité de la solution doivent être invariables. Si la liqueur contenant les extraits végétaux est trop riche en sucres, diminuer la prise de B, mais compléter toujours à 20 ml la prise d'essai avec de l'eau distillée.

Le poids de  $\text{O Cu}_2$  précipité dépend aussi de la nature des sucres. Des tables ont été faites pour les différents sucres.

- Avant d'utiliser la liqueur ferrique, vérifier qu'elle ne contient pas de sulfate ferreux. Verser goutte à goutte  $\text{Mn O}_4 \text{ K } 5 \text{ ‰}$  jusqu'à coloration rose de la liqueur. 2 à 3 gouttes suffisent en général.

- Pour chaque table de G. Bertrand, on peut tracer une courbe permettant une lecture directe de la quantité de sucre correspondant à la quantité de cuivre dosé.

TABLEAU DE CORRESPONDANCE pour  $\text{MnO}_4$  K 5 ‰

SUCRE INTERVERTI.

<u>SUCRE</u> mq	<u>CUIVRE</u> mq	<u>SUCRE</u> mq	<u>CUIVRE</u> mq
10	20,6	56	105,7
11	22,6	57	107,4
12	24,6	58	109,2
13	26,5	59	110,9
14	28,5	60	112,6
15	30,5	61	114,3
16	32,5	62	115,9
17	34,5	63	117,6
18	36,4	64	119,2
19	38,4	65	120,9
20	40,4	66	122,6
21	42,3	67	124,2
22	44,2	68	125,9
23	46,1	69	127,5
24	48,0	70	129,2
25	49,8	71	130,8
26	51,7	72	132,4
27	53,6	73	134,0
28	55,5	74	135,6
29	57,4	75	137,2
30	59,3	76	138,9
31	61,1	77	140,5
32	63,0	78	142,1
33	64,8	79	143,7
34	66,7	80	145,3
35	68,5	81	146,9
36	70,3	82	148,5
37	72,2	83	150,0
38	74,0	84	151,6
39	75,9	85	153,2
40	77,7	86	154,8
41	79,5	87	156,4
42	81,2	88	157,9
43	83,0	89	159,5
44	84,8	90	161,1
45	86,5	91	162,6
46	88,3	92	164,2
47	90,1	93	165,7
48	91,9	94	167,3
49	93,6	95	168,8
50	95,4	96	170,3
51	97,1	97	171,9
52	98,8	98	173,4
53	100,6	99	175,0
54	102,3	100	176,5
55	104,0		

TABMEAU DE CORRESPONDANCE pour  $\text{MnO}_4\text{K } 5 \text{ } \text{‰}$

---

GLUCOSE.

<u>SUCRE</u> mg	<u>CUIVRE</u> mg	<u>SUCRE</u> mg	<u>CUIVRE</u> mg
10	20,4	56	105,8
11	22,4	57	107,6
12	24,3	58	109,3
13	26,3	59	111,1
14	28,3	60	112,8
15	30,2	61	114,5
16	32,2	62	116,2
17	34,2	63	117,9
18	36,2	64	119,6
19	38,1	65	121,3
20	40,1	66	123,0
21	42,0	67	124,7
22	43,9	68	126,4
23	45,8	69	128,1
24	47,7	70	129,8
25	49,6	71	131,4
26	51,5	72	133,1
27	53,4	73	134,7
28	55,3	74	136,3
29	57,2	75	137,9
30	59,1	76	139,6
31	60,9	77	141,2
32	62,8	78	142,8
33	64,6	79	144,5
34	66,5	80	146,1
35	68,3	81	147,7
36	70,1	82	149,3
37	72,0	83	150,9
38	73,8	84	152,5
39	75,7	85	154,0
40	77,5	86	155,6
41	79,3	87	157,2
42	81,1	88	158,8
43	82,9	89	160,4
44	84,7	90	162,0
45	86,4	91	163,6
46	88,2	92	165,2
47	90,0	93	166,7
48	91,8	94	168,3
49	93,6	95	169,9
50	95,4	96	171,5
51	97,1	97	173,1
52	98,9	98	174,6
53	100,6	99	176,2
54	102,3	100	177,8
55	104,1		

TABLEAU DE CORRESPONDANCE pour  $MnO_4$  5 ‰

SACCHAROSE.

<u>SUCRE</u> mg	<u>CUIVRE</u> mg	<u>SUCRE</u> mg	<u>CUIVRE</u> mg
10	21,8	51	101,9
11	23,9	52	103,7
12	26,0	53	105,5
13	28,1	54	107,3
14	30,2	55	109,1
15	32,3	56	111,0
16	34,4	57	112,8
17	36,5	58	114,5
18	38,6	59	116,3
19	40,6	60	118,1
20	42,6	61	119,8
21	44,6	62	121,6
22	46,6	63	123,3
23	48,6	64	125,0
24	50,6	65	126,7
25	52,6	66	128,5
26	54,6	67	130,2
27	56,5	68	132,0
28	58,5	69	133,7
29	60,4	70	135,4
30	62,3	71	137,1
31	64,2	72	138,7
32	66,1	73	140,4
33	68,0	74	142,0
34	69,9	75	143,7
35	71,8	76	145,4
36	73,7	77	147,1
37	75,6	78	148,8
38	77,5	79	150,5
39	79,4	80	152,1
40	81,3	81	153,8
41	83,2	82	155,4
42	85,1	83	157,1
43	87,0	84	158,7
44	88,9	85	160,4
45	90,8	86	162,0
46	92,7	87	163,7
47	94,6	88	165,3
48	96,5	89	166,9
49	98,3	90	168,5
50	100,2	91	170,1
		92	171,7
		93	173,3
		94	175,0
		95	176,6

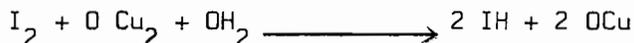
Microdosage des glucides par la méthode de SOMOGYI.

Lorsque l'on a à travailler sur de faibles quantités de matériel végétal ou sur un matériel très pauvre en glucides, on s'adresse alors à une microméthode, telle celle de SOMOGYI qui permet de doser des quantités de sucres comprises entre 0,01 et 3 mg, alors que par la méthode de Bertrand, il faut au minimum 10 mg par prise d'essai.

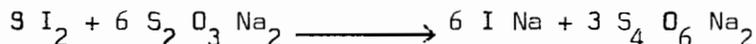
Les dosages s'effectuent à partir de la liqueur déféquée : la solution B.

Principes de la méthode.

Mis au contact d'une solution cuivrique, le sucre la réduit. Il se forme un précipité de  $\text{O Cu}_2$ . Puis l'oxyde cuivreux est réoxydé par l'iode pour donner l'oxyde cuivrique. Cét iode est libéré à partir d'un mélange d'iodate et d'iodure de potassium, en présence d'acide sulfurique.



L'iode restant est dosé par l'hyposulfite de soude.



La quantité d'iode restant dépend donc de la quantité de sucres contenus dans la solution.

La lecture des résultats se fait à l'aide de tables analogues à celles de Bertrand.

Remarque : Le réactif cuivrique utilisé est alcalinisé par de la soude et le milieu est tamponné par du phosphate bibasique de sodium. Il contient aussi du sulfate neutre anhydre de sodium qui protège l'oxyde cuivreux de la réoxydation par l'oxygène atmosphérique. Le tartrate double est là pour solubiliser l'hydrate de cuivre qui tend à se former.

Préparation des réactifs.

- $\text{SO}_4 \text{ H}_2$   $\frac{1}{2}$  N : Ajouter lentement dans 300 ml  $\text{H}_2 \text{ O}$  distillée 27 ml,5 de  $\text{SO}_4 \text{ H}_2$  pur à 66° B. Compléter à 500 ml après refroidissement.
- $\text{SO}_4 \text{ H}_2$   $\frac{1}{4}$  N : Diluer de moitié une partie de la solution précédente.
- $\text{HO Na}$   $\frac{1}{4}$  N : Peser 40 g. de soude en pastilles, les dissoudre dans un bécher avec de l'eau distillée. Après refroidissement, volumer dans une fiole jaugée à 1.000 ml.

- HO Na 10 % : Dissoudre 10 g. de soude en pastilles dans 100 ml d'eau distillée.
- Empois d'amidon 1 % : Peser 1 g. d'amidon dans un bécher de 150 ml, délayer dans 10 ml d'eau froide, verser sur la bouillie laiteuse obtenue 90 ml d'eau bouillante, porter deux minutes à l'ébullition douce, laisser refroidir et centrifuger s'il y a lieu.
- IK à 2,5 % : Peser 2g,5 d'iodure de potassium, ajuster à 100 ml avec de l'eau distillée, ajouter un peu de  $\text{CO}_3 \text{Na}_2$  pour alcaliniser et obtenir une conservation indéfinie.
- Solution cuivrique (Réactif A).

Dans 700 ml  $\text{H}_2 \text{O}$  distillée mettre :

28 g. de  $\text{PO}_4 \text{H Na}_2$  anhydre.  
40 g. de sel de sèignette.  
100 ml de HO Na N.  
8 g. de sulfate de cuivre en cristaux.  
180 g. de sulfate de sodium anhydre.  
eau distillée q s p 1.000 ml.

Laisser reposer 2 jours. Décanter et filtrer si cela est nécessaire.  
La liqueur est alors indéfiniment stable.

- Solution normale  $\text{IO}_3\text{K}$  (Réactif B).

Fabriquer une solution d'iodate de potassium normale à partir de  $\text{IO}_3 \text{K}$  cristallisé pur pour analyses.

La solution N contient 1/6 de molécule-gramme par litre.

$\text{IO}_3 \text{K} = 214,02$  donc  $\frac{214,02}{6} = 35,670$  g. Le sel doit être séché à l'étuve à  $150^\circ$ .

- Préparation de la liqueur 0,005 N d'hyposulfite de sodium.

Les solutions très diluées d'hyposulfite de sodium ne sont pas stables. La solution 0,005 N ne sera donc préparée qu'en petite quantité, à partir d'une solution N/10, pour un emploi immédiat.

- Prendre 25 ml de la solution N/10 et les mettre dans une fiole de 500 ml.
- Ajouter 2 ml de soude à 10 % pour éviter l'action du  $\text{CO}_2$  atmosphérique.
- Etendre à 500 ml avec de l'eau distillée. Agiter.

Calcul de la normalité

25 ml de la solution N/10 étendus à 500 ml donnent 500 ml de liqueur 0,005 N.

Si la solution de base était à 0,093 N; nous aurions :

$$25 \times 0,093 = 2,325 = 500 \times$$

$$x = \frac{2,325}{500} = 0,00465 \text{ donc } N = 0,00465$$

1 ml d'hyposulfite 0,005 N = x ml à 0,00465

$$0,005 = 0,00465 \times$$

$$x = \frac{0,005}{0,00465} = 1 \text{ ml},075$$

1 ml d'hyposulfite 0,005 N = 1 ml,075 d'hyposulfite 0,00465 N.

Ce calcul est nécessaire pour pouvoir utiliser les tables de références qui sont rédigées en  $S_2 O_3 Na_2$  0,005 N.

Mélange solution cuivrique - solution d'iodate

Trois cas peuvent se présenter :

1°/ 0,01 à 0,5 mg de sucre (Réactif A : 50 ml  
dans la prise d'essai (Réactif B : 0,25 ml

2°/ 0,5 à 1 mg de sucre (Réactif A : 50 ml  
dans la prise d'essai (Réactif B : 0,50 ml

3°/ 1 à 3 mg de sucre (Réactif A : 50 ml  
dans la prise d'essai (Réactif B : 1,25 ml

Lorsqu'aucun dosage n'a encore été fait, prendre d'abord le mélange. Faire le calcul approximatif du pourcentage de sucres. Refaire le dosage avec le mélange convenable.

DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS

- Dans un tube pyrex de 25 x 200 mm, mettre 5 ml de la solution B et 5 ml de la solution cuivrique-iodate (Réactif A + B).

- Mettre au bain-marie bouillant 15 minutes en ayant soin de fermer les tubes avec un obturateur en verre.

- Refroidir rapidement les tubes dans un récipient contenant de l'eau froide. Le précipité  $O\ Cu_2$  se forme.
- Ajouter l'iodure en le faisant couler le long de la paroi du tube, sans agiter. Dans les 3 cas cités précédemment, respectivement :

0,5 ml pour le 1er cas.  
1 ml pour le 2ème cas.  
2 ml pour le 3ème cas.

- Puis rapidement, mettre 2 ml de  $SO_4\ H_2\ 2\ N$ , pour acidifier le tout en même temps.  
L'iode restant est dosé par l'hyposulfite de sodium.
- Verser d'abord l'hyposulfite jusqu'à coloration jaune très clair.
- Ajouter l'empois d'amidon.
- Continuer à verser l'hyposulfite jusqu'à décoloration complète.

Pour chaque dosage ou série de dosages, faire un blanc, en remplaçant la solution sucrée par 5 ml d'eau distillée, et lui faire subir le même traitement dans les mêmes conditions que pour les solutions sucrées.

Pour une même solution, faire plusieurs essais.

La limite supérieure de la méthode étant de 3 mg de sucre pour le glucose, dans les 5 ml de la prise d'essai, si la solution B est trop concentrée, faire une dilution, mais prendre toujours un volume de 5 ml pour le dosage.

Calculs :

Solution B : 200 ml  
Prise d'essai de B : 5 ml  
Titre solution hyposulfite : 0,00465 N

Si l'hyposulfite versé pour l'essai est de 18,5 ml et pour l'essai à blanc 23 ml,

$23 - 18,5 = 4,5$  ml de  $S_2\ O_3\ Na_2$  0,00465 N correspondent au sucre présent dans le dosage,

$$\text{Soit en } S_2\ O_3\ Na_2\ 0,005\ N\ \frac{4,5}{1,075} = 4,18$$

Dans le tableau de correspondance du glucose 3,7 ml d'hyposulfite = 0,5 mg de glucose

$$\frac{0,5 \times 4,18}{3,7} = 0,564\ \text{mg dans les 5 ml de la solution B}$$

donc  $\frac{0,564 \times 200}{5} = 22,56$  mg dans la solution B

#### DOSAGE DES SUCRES TOTAUX

- Prendre 10 ml de la solution B, les introduire dans une fiole de 20 ml.
- Ajouter  $\text{SO}_4 \text{H}_2 \text{N}$  jusqu'à pH 2 (contrôle au papier pH).
- Porter au bain-marie bouillant. Maintenir l'ébullition 15 minutes.
- Laisser refroidir.
- Ajouter de la soude environ normale jusqu'à pH 6. Compléter à 20 ml; dans cette fiole se trouve la solution C qui sert au dosage des sucres totaux.
- Faire une prise de 5 ml dans la solution C et procéder ensuite comme pour les sucres réducteurs.

Calculs :

On a dosé ici les sucres totaux qui sont la somme sucres réducteurs plus sucres hydrolysables.

Solution B = 200 ml  
Prise d'essai de C : 5 ml  
Titre hyposulfite : 0,00465 N

Hyposulfite utilisé pour l'essai : 14 ml  
Hyposulfite utilisé pour le blanc : 23 ml.

$23 - 14 = 9$  ml pour les sucres totaux dans la prise de 5 ml de C qui est 2 fois plus diluée que B soit  $\frac{9}{1,075} = 8,37$  ml d'hyposulfite 0,005 N

Dans le tableau de correspondance  
1 mg glucose = 7,4 hyposulfite

$\frac{100 \times 8,37}{7,40} = 113,13$  de sucre dans 5 ml de C ou 2,5 ml de B.

$\frac{1,13 \times 200}{2,5} = 90,4$  mg de sucres totaux dans la solution B.

Pour obtenir les sucres hydrolysables dans la solution B, il faut soustraire de la somme des sucres totaux, les sucres réducteurs.

$90,40 - 22,56 = 67,84$  mg

Il est aussi possible de calculer directement les sucres hydrolysables  
 $(9 \times 2) - 4,5 = 13,5$  d'hyposulfite 0,00465 pour les sucres hydrolysables

$$\frac{13,5}{1,075} = 12,55 \text{ d'hyposulfite } 0,005 \text{ N.}$$

Dans le tableau de correspondance 11,10 ml = 1 mg,5 de glucose.

$$\frac{1,5 \times 12,55}{11,1} = 1,696 \text{ mg dans } 5 \text{ ml de B ou } 10 \text{ ml de C.}$$

$$\frac{1,696 \times 200}{5} = 67,84 \text{ mg dans B.}$$

Ces résultats sont donnés en glucose. Il en est toujours ainsi lorsque l'on ne connaît pas la nature exacte des sucres.

Ces chiffres doivent être rapportés au poids sec du matériel végétal analysé. On peut, comme pour les tables de Bertrand, tracer des courbes et lire directement le chiffre trouvé.

Tableaux de correspondance.

Glucose

7ml,4 de solution 0,005 N d'hyposulfite = 1 mg de glucose

1 ml de solution 0,005 N d'hyposulfite = 0 mg,136 de glucose.

Glucose en mg	Hyposulfite 0,005 N en ml	Glucose en mg	Hyposulfite 0,005 N en ml	Glucose en mg	Hyposulfite 0,005 N en ml
0,01	0,09	0,75	5,55	2,00	14,80
0,05	0,38	1,00	7,40	2,25	16,65
0,10	0,74	1,25	9,25	2,50	18,50
0,20	1,46	1,50	11,10	2,75	20,35
0,50	3,70	1,75	12,95	3,00	22,20

## DOSAGE DE L'AMIDON DANS LES VEGETAUX

L'amidon extrait des végétaux n'est pas un glucide homogène car il est composé de deux fractions : l'amylopectine et l'amylose.

On dose l'amidon sur le résidu insoluble dans l'alcool, préalablement broyé finement et homogénéisé.

### I - Hydrolyse de l'amidon par la pancréatine.

Parmi les méthodes de dosage de l'amidon par hydrolyse enzymatique, nous avons retenu spécialement l'hydrolyse à la pancréatine. C'est une poudre préparée à partir de pancréas de porc.

#### Principe de la méthode :

Le maltose libéré par l'action de l'amylase est alors transformé en glucose. Ainsi, la presque totalité de l'amidon se trouve convertie en glucose. Il ne reste plus dans la solution, en dehors du glucose, que quelques molécules d'holosides réducteurs correspondant aux anciens points de ramification des chaînes constituant l'amylopectine (Liaisons 1 - 6). On dose les sucres réducteurs exprimés en glucose.

L'adjonction de Cl Na en proportion convenable, accélère la vitesse de l'hydrolyse.

#### Réactifs

- Pancréatine de porc
- Chlorure de sodium
- Toluène
- ainsi que les réactifs pour le dosage des sucres.

#### Préparation de l'empois et hydrolyse.

- Peser à la balance de précision 1 g. de poudre végétale provenant du résidu insoluble dans l'alcool, séché préalablement à l'étuve à vide à 50°, pendant 5 heures.

- Délayer la poudre avec 10 ml H<sub>2</sub>O distillée dans un bécher de 100 ml. Parfois, la poudre étant très absorbante, il peut être nécessaire d'ajouter plus d'eau distillée afin d'obtenir une pâte presque liquide.

- Verser sur la bouillie obtenue 20 ml environ d'eau bouillante,

- Porter immédiatement sur une plaque chauffante et maintenir une ébullition douce pendant 10 minutes.

- Laisser refroidir, verser seulement le liquide sur un filtre (filtration lente) taré, au-dessus d'une fiole de 100 ml. Ne pas entraîner de poudre de l'échantillon.

- Ajouter de nouveau 20 ml d'eau distillée bouillante sur la poudre restée dans le bécher de 100 ml.

- Porter de nouveau immédiatement sur une plaque chauffante et maintenir une ébullition douce pendant 10 minutes.

- Laisser refroidir, puis verser le liquide sur le 1er filtre, entraîner ensuite la poudre à l'aide d'un jet de pissette, rincer le bécher et le filtre.

- Ajouter alors dans l'ordre

2 g. de pancréatine  
2 g. de chlorure de sodium  
10 gouttes de toluène.

- Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée, boucher, agiter très soigneusement.

- Mettre à l'étuve à 40° C pendant 24 heures.

- Retirer de l'étuve au bout de ce temps, refroidir le liquide.

- Laisser décanter si nécessaire et filtrer sur filtre plissé.

Faire le dosage des sucres sur une partie aliquote du filtrat de la même façon que pour les sucres réducteurs. En général, il n'est pas nécessaire de déféquer l'hydrolysât.

Les tables utilisées seront celles du glucose et les résultats seront exprimés par rapport à la matière sèche.

## II - Hydrolyse acide de l'amidon par Cl H 5 %.

### Principe de la méthode :

Les acides dilués à l'ébullition hydrolysent l'amidon en dextrines, puis finalement en glucose.

### Réactifs

- Acide chlorhydrique 5 % en poids

Prendre 29 ml Cl H (1,19) volumer à 250 ml. Agiter soigneusement.

- Soude à 10 %.  
Dissoudre 10 g. HO Na en pastilles dans 100 ml d'eau distillée.
- Liqueurs nécessaires pour le dosage des sucres.

Mode opératoire.

- Peser 1 g. de poudre végétale provenant du résidu insoluble dans l'alcool, séché préalablement à l'étuve à vide à 50° pendant 5 heures.
- Introduire la poudre dans un ballon à hydrolyse.
- Ajouter 30 ml Cl H à 5 %, bien mouiller la poudre.
- Porter à l'ébullition sous réfrigérant à reflux pendant 1 heure.
- Laisser refroidir.
- Filtrer sur filtre lent préalablement taré, au-dessus d'une fiole jaugée de 100 ml.
- Rincer le ballon et le filtre à l'eau distillée.
- Neutraliser l'acidité du liquide par la soude à 10 % jusqu'à pH 6 environ (contrôler au papier pH).
- Volumer après refroidissement total, boucher, agiter.
- Faire le dosage des sucres sur une partie aliquote du filtrat de la même façon que pour les sucres réducteurs solubles dans l'alcool.  
En général, il n'est pas nécessaire de déféquer.

Les tables utilisées seront celles du glucose et les résultats seront exprimés par rapport à la matière sèche.

CHROMATOGRAPHIE DES SUCRES.

La chromatographie sur papier permet une caractérisation qualitative et éventuellement quantitative des différents sucres.

On utilise ici une chromatographie descendante.

La solution d'extraits végétaux utilisée pour cette chromatographie sera la solution B ou toute autre solution déféquée dans les mêmes conditions.

Il faut que le jus soit absolument limpide et très peu coloré.

La quantité de liquide à déposer est variable et dépend de la dilution de la solution et de sa richesse en différents sucres.

Solutions et réactifs :

- Solutions de référence.

- Fructose en solution à 3 %
- Glucose 1 H<sub>2</sub> O en solution à 4 %
- Raffinose en solution à 3 %
- Saccharose en solution à 3 %

- Solvant.

- Butanol 120 ml
- Eau distillée 57 ml
- Ethanol 95° 33 ml

Bien mélanger et utiliser 100 ml par chromato.

- Révélateurs.

Pour le glucose (1,66 g. d'acide phtalique ou 1,48 g. d'anhydride phtalique  
(0,93 g. d'aniline  
dissoudre dans q.s.p. de butanol saturé d'eau.

Pour les cétooses ( 5 g. d'urée  
(20 ml ClH 2 N  
ajouter environ 80 ml d'éthanol à 95°.

Matériel.

- Papier à chromato Whatman n° 4; on peut utiliser aussi le n° 1 qui est environ deux fois plus lent et donne en général des spots plus ronds.
- Boite à chromatogramme munie d'un dispositif de séchage des spots.
- Micropipette Shandon de 0,01 ml.

- Cuve à chromatographie de 50 x 20 x 50 munie d'un couvercle rodé et de 2 augettes, 2 presse-papier en verre et 2 tiges de verre support.
- Pulvérisateur pour révélateur.
- Etuve à révélation réglée à 105° C.

#### Préparation d'un chromatogramme.

- Repérer le sens d'écoulement du papier; en effet, l'écoulement du solvant doit se faire obligatoirement dans le sens de la flèche placée sur chaque boîte de papier.
- Couper la feuille à 4 cm du bord pour éviter que par la suite elle ne touche le fond de la cuve.
- Tracer au crayon noir la ligne de départ à 11 cm de l'extrémité de la feuille et exactement parallèle à celle-ci.
- Marquer sur cette ligne des points (toujours au crayon noir) distants de 3 en 3 cm.
- Denteler l'autre extrémité de la feuille pour éviter par la suite l'accumulation du solvant.
- Placer la feuille dans la boîte à chromatogramme de façon à voir parfaitement la ligne de départ où seront déposées les micro-gouttes de solution.
- Déposer à l'aide d'une micropipette de 0,01 ml les témoins et les solutions à analyser sur chacun des points préalablement marqués. Sécher soigneusement après chaque dépôt. La micropipette doit être tenue bien verticalement et toucher légèrement le papier.

Une fois la préparation terminée, placer le chromatogramme dans la cuve à chromatographie.

Nota : Ne pas déposer plus de 1000  $\mu$ g de sucres par spot car la séparation risquerait de ne pas être très nette; pour cela se référer à l'analyse chimique ou faire des essais préalables.

Pour une même chromatographie, déposer toujours X gouttes correspondant à un nombre déterminé de mg de matériel végétal exprimé à la matière sèche de référence.

### Utilisation d'une cuve à chromatographie.

- Saturer la cuve par le solvant employé, à cet effet placer dans le fond de la cuve, au centre (pour ne pas toucher les feuilles de papier), un béccher de 250 ml contenant 200 ml du mélange butanol-eau-éthanol.
- Installer les augettes parfaitement horizontales, vérifier au besoin avec un niveau à bulle.
- Placer le haut du chromatogramme dans l'augette de façon que la ligne de départ se trouve en-dessous de la tige de verre du support et parfaitement horizontale. La feuille est maintenue en place au moyen d'une épaisse tige de verre coudée aux deux extrémités, au fond de l'augette, et passe ensuite sur la tige support pour retomber verticalement vers le fond de la cuve. Veiller à ce que le papier ne touche pas la cuve elle-même.
- Placer le couvercle et attendre 3 heures que l'atmosphère se sature bien de solvant, avant d'introduire par les trous qui se trouvent exactement au-dessus des augettes, 100 ml de solvant. Utiliser un entonnoir et vider le liquide très doucement. Obturer ensuite les trous, au moyen de bouchons en caoutchouc.

La chromatographie doit se faire à température constante. Plus la température est élevée, plus les spots descendent vite.

Laisser le chromatogramme dans la cuve de 20 à 24 heures.

Après ce temps, sortir le chromatogramme avec sa tige support et le mettre sécher à l'air, sous une hotte ventilée.

### Révélation des chromatogrammes.

#### 1/ Glucose.

Après séchage total, vaporiser le révélateur phtalate d'aniline sur le chromatogramme, puis placer celui-ci dans une étuve à 105° C pendant 10 minutes. Apparition de taches brunes s'il y a du glucose.

#### 2/ Cétoses.

Vaporiser le révélateur urée plus acide chlorhydrique sur la chromatogramme puis placer celle-ci rapidement à l'étuve à 105° C pendant 2 minutes. Des taches bleutées apparaissent alors s'il y a des cétooses ou des oligosaccharides.