

LES GLUCIDES

Sous chapitre 4

PRINCIPALES METHODES D'ANALYSE DES GLUCIDES

I. EXTRACTIONS SELECTIVES

1°) Oses et oligosides

Ce sont des molécules hydrosolubles, on peut les extraire en les faisant passer en solution aqueuses :

- à chaud en milieu neutre (car un milieu acide risque de provoquer des hydrolyses et un milieu basique des isomérisations)
- en présence d'éthanol (ce qui permet de neutraliser toutes enzymes en les dénaturant).

2°) Les polysides

Ce sont des molécules hydrophiles mais pas toujours hydrosolubles, et facilement hydrolysables ce qui rend leur extraction délicate. Exemples :

- amidon : extraction par le DMSO (diméthylsulfoxyde)
- cellulose : extraction par la liqueur de Schweitzer (solution ammoniacale d'hydroxyde de cuivre); la cellulose est ainsi solubilisée et on peut ensuite la faire précipiter par acidification.

II. FRACTIONNEMENT ET IDENTIFICATION

1°) Fractionnement

Des oses et osides

- Chromatographie d'adsorption sur couche mince
- Chromatographie d'échanges d'ions après complexation à l'acide borique

Des polyosides

- Chromatographie d'exclusion moléculaire

2°) Identification

Méthodes fondées sur les propriétés réductrices des sucres

- Réduction de la liqueur de Fehling → disparition de la couleur bleue et formation d'un précipité rouge
- Réduction du nitrate d'argent ammoniacal → apparition d'un miroir d'argent
- Réduction de l'acide picrique (jaune) → formation d'acide picramique rouge

Méthodes fondées sur les réactions furfuraliques des sucres

- Réaction de caractérisation des sucres :
 - réaction de Molisch (α naphthol) → coloration brun-violet avec tous les oses
- Réactions de différenciations :
 - réaction de Bial (orcinol) → coloration verte avec les pentoses
 - réaction de Sélivanoff (résorcinol) → coloration rouge qui apparaît rapidement (en moins de 5 minutes) avec les cétooses
- Réaction à l'iode
 - coloration bleue intense caractéristique de l'amidon
 - coloration brun-acaïou caractéristique du glycogène
- Formation d'osazones

Méthode comparative

Les différents types de chromatographies utilisées pour séparer les sucres peuvent être menées en parallèle pour la solution à analyser et des solutions témoins.

La comparaison des résultats obtenus permet d'identifier le ou les sucres de la solution inconnue.

III . DOSAGE DES OSES ET OSIDES

1°) Méthodes physiques

- Polarimétrie : Fondée sur le pouvoir rotatoire des sucres (Loi de Biot : $\alpha = \alpha^\circ \times l \times C$)
- Réfractométrie : L'indice de réfraction d'une solution aqueuse de sucres augmente avec la concentration ($n = n^\circ \times k \times C$)
- Viscosimétrie : La viscosité d'une solution aqueuse de sucres varie avec la concentration de la solution.

Toutes ces méthodes sont rapides mais ne donnent des résultats satisfaisants que si les solutions sont concentrées. Elles sont donc surtout utilisées en industrie. De plus, elles ne sont pas spécifiques.

2°) Méthodes chimiques

a) Méthodes réductimétriques

Elles sont fondées sur le pouvoir réducteur des oses et osides, pouvoir lié à la présence d'une fonction hémiacétalique libre. Ce pouvoir réducteur s'exprime en milieu basique et à chaud.

L'oxydation des sucres réducteurs dans ces conditions est une réaction complexe et non stoechiométrique :



Cela implique donc la préparation d'un **étalon** ou d'une **gamme d'étalonnage**, ou bien l'utilisation d'une **table**, toutes les expériences devant être réalisées dans les mêmes conditions opératoires strictement respectées.

On distingue:

- des méthodes par comparaison (Fehling)
- des méthodes à relation empirique (Bertrand)
- des méthodes colorimétriques

On peut également classer ces méthodes selon la nature de l'oxydant :

- méthodes cuprimétriques (Fehling, Bertrand, Luff...)
- méthodes mercurimétriques (Baudoin-Lewin)
- méthodes ferriques (Hagedorn-Jensen)
- méthodes par réduction de composés organiques (ex: DNS)

b) Méthodes furfuraliques

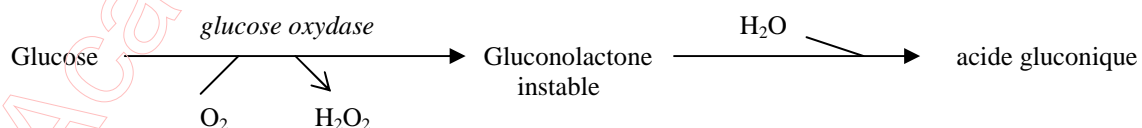
Les oses ayant un nombre de carbone au moins égale à 5 sont déshydratés en milieu acide acétique concentré et à chaud en dérivés furfuraliques, ces dérivés pouvant ensuite se condenser avec des phénols ou des amines cycliques pour former des composés colorés qui absorbent spécifiquement à une longueur d'onde donnée.

Exemple : méthode colorimétrique à l'orthotoluidine (apparition d'une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en aldohexoses dans la solution testée).

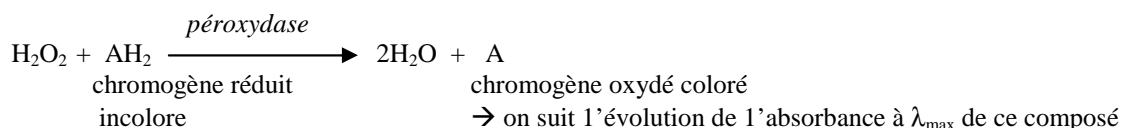
Toutes ces nombreuses méthodes sont peu spécifiques et souvent fastidieuses. Beaucoup sont désuètes et ne sont plus utilisées de façon courante dans les laboratoires d'analyses.

3°) Méthodes enzymatiques

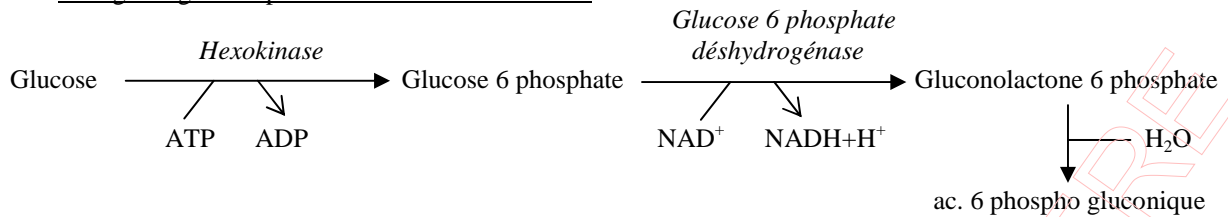
- Dosage du glucose par la méthode à la glucose oxydase



L'évolution de cette réaction est suivie grâce à une réaction indicatrice, catalysée par une peroxydase.



➤ Dosage du glucose par la méthode à l'hexokinase



On suit l'évolution de l'absorbance à la longueur d'onde d'absorption maximum du NADH.

Ces enzymes peuvent être utilisées :

- sous forme soluble : kit enzymatique, souvent en point final,
- fixées à des membranes pour fabriquer par exemple des électrodes à enzyme (ex : électrode à glucose).

L'avantage de ces méthodes est leur spécificité et leur simplicité à mettre en œuvre.

IV. DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OSIDES

L'étude d'un oside consiste à déterminer le nombre et la nature des oses constitutifs, ainsi que les modes de liaison entre ces oses. Pour cela, on procède par étape :

Détermination de la masse molaire

→ Cela permet d'évaluer la longueur des chaînes dans le cas des polyosides.

Hydrolyse totale : hydrolyse chimique, en milieu acide et à chaud

→ Cette hydrolyse libère les oses dont on détermine la nature par chromatographie.

Recherche d'un pouvoir réducteur

→ Cela apporte un renseignement important sur le mode de liaison entre les oses pour les oligosides (présence d'une fonction hémiacétalique libre).

Hydrolyse chimique partielle

→ Peuvent contribuer à déterminer la nature et l'enchaînement des oses constitutifs.

Hydrolyses enzymatiques

→ Très spécifiques, elles permettent de préciser la nature, la structure et le mode de liaison entre les oses constitutifs.

Méthylation suivie d'hydrolyse acide ménagée

→ Permet de déterminer les groupements engagés dans les liaisons osidiques (non méthylés).

Oxydation périodique

→ Permet aussi de déterminer les groupements engagés dans les liaisons osidiques, ainsi que la forme furanique ou pyranique des oses.