

TP SUR LES SUCRES

Etude des fraises Tagada Haribo

Composition des fraises (figurant sur le paquet) : glucose , saccharose , gélatine , acidifiant , colorants rouges .

But du TP :

vérifier la présence de certains sucres dans leur composition par chromatographie sur couche mince
dosier la quantité de glucose par spectrophotométrie

Ces manipulations sont réalisables en 2 h .

Elles ont été élaborées par B.Discamps (Lycée Bel Orme , Bordeaux) et F.Rivoal (Lycée Saint Louis , Bordeaux) et proposées au concours régional des Olympiades de la Chimie à Bordeaux à des élèves de Terminale S et STL CLPI en 2000.

Protocole

1. Solubilisation des fraises

Matériel et produit :

- plaque chauffante agitante + barreau aimanté + cristalliseur
- support
- noix de fixation
- ballon ou erlen
- thermomètre
- balance à 0,01 g
- capsule de pesée
- couteau ou ciseaux
- fioles jaugées de 200 mL et 500 mL
- pipette jaugée de 5 mL et propipette
- deux béchers de 150 mL
- entonnoir + support + 2 filtres en papier
- noir animal et spatule
- carbonate de potassium
- bâton en verre

Manipulation :

- peser avec précision quatre fraises
- introduire les quatre fraises dans le ballon ou l'erlen avec environ 100 mL d'eau après les avoir coupées au couteau sur du papier filtre (attention à ne rien perdre).
- Ajouter une spatulée de carbonate de potassium K_2CO_3
- Chauffer au bain marie entre 30 et 40°C en agitant jusqu'à dissolution complète
- refroidir
- transvaser toute la solution dans une fiole jaugée de 200 mL. Ajuster avec de l'eau distillée.

- verser une partie de cette solution dans un bécher .Y ajouter une spatulée de noir animal .Agiter quelques instants jusqu'à décoloration . Filtrer éventuellement sur deux filtres plissés superposés. Soit A la solution obtenue.
- Diluer 100 fois la solution A. Soit A' la solution diluée .

2. Chromatographie sur couche mince (CCM) des sucres :

Matériel et produits :

- une cuve saturée d'éluant (ici un mélange de 3 volumes de butan-2- one , 1 volume de méthanol et 1 volume d'acide éthanoïque)
- une plaque de chromatographie (gel de silice)
- des solutions étalons de glucose et de saccharose à 10 g /L
- solution A préparée précédemment
- capillaires pour faire les dépôts
- révélateurs des sucres (on mélange au dernier moment deux solutions A et B .Solution A : 0,5 mL d' aniline , 0,5 g de diphenylamine, 25 mL d'éthanol .Solution B : 5 mL d'acide phosphorique concentré et 25 mL d'éthanol) + pinceau
- plaque chauffante à utiliser sous la hotte
- gants

Manipulation :

- manipuler la plaque en évitant de mettre les doigts dessus
- tracer la ligne de dépôts des solutions à 1 cm environ du bas de la plaque avec un crayon gras sans appuyer
- avec les capillaires déposer les solutions étalons et A (taches de diamètre inférieur à 3 mm) en les repérant (G , S et A) . Sécher au sèche -cheveux et recommencer l'opération .
- introduire délicatement la plaque dans la cuve
- lorsque le front de solvant est à 1 cm du bord supérieur , retirer la plaque
- la sécher au sèche-cheveux
- les solutions étant incolores , révéler les plaques : appliquer le révélateur au pinceau sur l'ensemble de la plaque puis la passer au-dessus d' une plaque chauffante sous la hotte jusqu'à apparition des taches.
- vérifier la présence de glucose et de saccharose dans les fraises

3. Dosage spectrophotométrique du glucose

Matériel et produits :

- solution A' préparée précédemment
- pipette jaugée de 1 mL + propipette
- pipette jaugée de 2 mL
- solution étalon de glucose à 0,100 g/L notée E .
- réactif R spécifique du glucose (« Glucose RTU » : composition :solution tampon de pH 7 , phénol, aminoantipyrine, peroxydase et glucose oxydase .Fournisseur : Biomérieux)
- 5 cuves de spectrophotométrie
- un spectrophotomètre visible
- parafilm
- étuve à 40 °C

Principe du dosage :

On réalise l'oxydation du glucose $C_6H_{12}O_6$ par le dioxygène. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la glucose oxydase. Celle-ci est spécifique du glucose : seule l'oxydation de ce sucre qui est catalysée sera observée.

Le glucose est transformé en acide gluconique.

L'eau oxygénée H_2O_2 formée réagit ensuite avec le phénol pour donner la benzoquinone selon une réaction catalysée par une autre enzyme, la peroxydase.

La benzoquinone formée réagit sur la 4-aminoantipyrine pour former un produit coloré rose (voir annexe)

Toutes ces réactions s'effectuent en milieu tamponné neutre.

On mesure l'absorbance de ce produit qui est fonction de la concentration en glucose initial.

Manipulation :

- Préparer en même temps directement dans cinq cuves spectrophotométriques les mélanges suivants :
 - cuve n° 1 : cuve de référence : 2 mL de réactif R + 1 mL d'eau distillée .
 - cuves n° 2 et n° 3 : cuves étalons identiques : 2 mL de réactif R et 1 mL de solution étalon de glucose E.
 - cuves n° 4 et n° 5 : cuves échantillons identiques : 2 mL de réactif R et 1 mL de solution A' .
- Boucher les cuves avec du Parafilm® . Agiter .
- Laisser les cuves à l'étuve à 40 °C pendant 15 minutes.
- Retirer les cuves . Laisser refroidir 10 minutes avant de faire les mesures d'absorbance à 505 nm.

Remarques :

- la linéarité entre l'absorbance et la concentration en glucose est bonne jusqu'à des concentrations de 4 g/L .
- Si on dispose de plus de temps , on peut procéder autrement : préparer une gamme de solutions étalons .

QUESTIONNAIRE

1. Masse des quatre fraises :

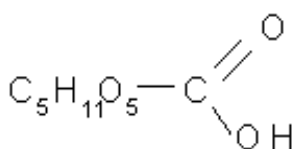
m = g
--

2. Quelle propriété chimique du carbonate de potassium met-on à profit ici ? Quelle réaction secondaire empêche-t-il ?
Grâce au caractère basique des ions carbonate, on évite l'hydrolyse du saccharose.
3. Pourquoi a-t-on décoloré la solution initiale ?
Les colorants présents dans les fraises sont rouges, ils absorberaient à 505 nm.
4. Expliquer le principe de la chromatographie
5. Expliquez votre raisonnement pour confirmer la présence de glucose et de saccharose dans les fraises.
6. Que sont le glucose et le fructose l'un par rapport à l'autre ?
7. Ecrire l'équation de réaction entre le glucose et le dioxygène en milieu aqueux.

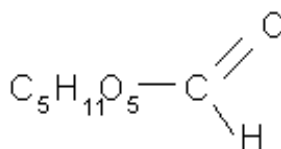
Données :

pouvoir oxydant (O_2 / H_2O_2) > pouvoir oxydant (acide gluconique / glucose)

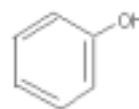
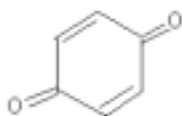
acide gluconique :



glucose :



8. Quelle fonction organique présente dans le glucose intervient dans la réaction chimique précédente ?
9. Citer un test permettant de mettre en évidence cette fonction.
10. Quelle autre fonction présente aussi le glucose ?
11. Ecrire l'équation de réaction entre l'eau oxygénée formée et le phénol.
 Données : pouvoir oxydant (H_2O_2 / H_2O) > (benzoquinone / phénol)



Benzoquinone :

Phénol :

12. Valeurs lues des absorbances sur le spectrophotomètre.

Cuve n° 2 : étalon	Absorbance = A_2 =	Valeur moyenne :
Cuve n° 3 : étalon	Absorbance = A_3 =	
Cuve n° 4 : solution A'	Absorbance = A_4 =	Valeur moyenne :
Cuve n° 5 : solution A'	Absorbance = A_5 =	

$$A_e = (A_2 + A_3) / 2 =$$

$$A_{a'} = (A_4 + A_5) / 2 =$$

13. Déduire de la loi de Beer-Lambert la relation entre l'absorbance lue pour la solution de glucose étalon A_e , l'absorbance de la solution A' : A_a' , la concentration étalon C_e et la concentration de A' en glucose C' .
14. En déduire la concentration C de la solution A .
15. En déduire la masse de glucose présente dans les quatre fraises pesées (masse molaire du glucose $M = 180$ g/mol)
16. En déduire le pourcentage en masse de glucose présent dans les fraises.

Bibliographie :

- **documentation bioMérieux**
- **Biochimie clinique. Tome 1 : biochimie analytique. P.Métais et al . Editions Simep**
- **Biochimie clinique. S.Bernard. Editions Maloine.**

Annexe :

