

# Thèse

présentée par



**Danielle DERENSY - DRON**

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université  
en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité: Biochimie

## **Etude structurale de polymères glucidiques de type Polydextrose**

Soutenue le mardi 28 avril 1998 devant la commission d'examen:

**Président:** Professeur André VERBERT  
**Rapporteurs:** Professeur Edmond De HOFFMANN  
Docteur Eric FOREST  
**Examineurs:** Professeur Geneviève SPIK  
Docteur Philippe LOOTEN  
Docteur Jean-Claude MICHALSKI

A Eric et Estelle.

Ce travail effectué à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, au sein du Laboratoire de Chimie Biologique (UMR du CNRS n°111: Relation structure - fonction des constituants membranaires), dirigé par le Professeur André Verbert, a bénéficié d'un financement industriel de la Société Roquette (Lestrem).

Le travail a été entrepris en novembre 1992 sous la direction du Professeur Bernard Fournet, décédé accidentellement le 6 janvier 1993.

A partir de novembre 1994, le Professeur Bruno Domon a dirigé cette thèse jusqu'à une interruption pour cause d'arrêt maladie en novembre 1995.

Monsieur le Professeur André Verbert en a alors assuré la direction « intérimaire » à partir de janvier 1993 et ce jusqu'à ce jour.

## **A la mémoire du Professeur Bernard FOURNET**

Trop tôt disparu, il n'a pu me faire l'honneur de diriger cette recherche et juger ce travail. Que la confiance qu'il m'avait témoignée soit en ce jour remerciée par ce mémoire qui, je l'espère, correspond à ce qu'il aurait souhaité.

En hommage à son amour pour la recherche scientifique et à ses qualités humaines.

**A Monsieur le Professeur André VERBERT**

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire où s'est concrétisée cette thèse et vous me faites aujourd'hui l'honneur d'en présider le jury. De plus, malgré vos charges, vous avez toujours été disponible pour me conseiller et m'encourager. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon plus profond respect.

**A Monsieur le Professeur Edmond De HOFFMANN**

Malgré vos nombreuses responsabilités, vous avez accepté de contribuer à l'amélioration de ce manuscrit en me faisant l'honneur de le juger et de l'enrichir de vos connaissances. Soyez conscient que vous m'avez permis de concrétiser cette thèse. Pour tout cela, et pour simplement avoir pu discuter avec vous, veuillez accepter mes plus sincères remerciements.

**A Monsieur le Docteur Eric FOREST**

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail en acceptant la responsabilité de rapporteur. Je vous prie de croire en l'expression de mes respectueux remerciements.

### **A Madame le Professeur Geneviève SPIK**

Je tiens à vous remercier pour votre présence dans ce jury ainsi que pour cette année 1997, un peu particulière, de transition entre la thèse et la soutenance durant laquelle j'ai eu la chance de compléter ma connaissance des glycoconjugués grâce à un contrat industriel avec la société Pharming (Hollande).

### **A Monsieur le Docteur Philippe LOOTEN**

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail et d'acquérir une première expérience dans l'industrie. D'autre part, vous m'avez fait le plaisir de suivre et de discuter les résultats ainsi que de m'accueillir aussi souvent que nécessaire dans votre service. Ces rencontres m'ont aussi permis de surmonter les moments difficiles qui ont pu se produire au cours de ces années. Pour tout ceci, je tiens à vous adresser ma sincère reconnaissance et mes plus vifs remerciements.

### **A Monsieur le Docteur Jean-Claude MICHALSKI**

Tu m'honores aujourd'hui de ta présence dans le jury. Pour avoir su me conseiller, m'encourager et pour la confiance que tu as toujours eue en moi, reçois, en toute amitié, mes plus chaleureux remerciements.

### **A Monsieur le Professeur Bruno DOMON**

A votre arrivée au laboratoire, vous m'avez orientée sur les voies de la chimie des sucres et de la spectrométrie de masse. Je vous remercie d'avoir fait progresser le sujet de recherche par votre curiosité et vos compétences scientifiques. Dommage que cela n'ai été que de courte durée.

J'ai été très sensible à la disponibilité, la compétence et la gentillesse de tous ceux qui m'ont accueillie au sein de la Société Roquette. Plus particulièrement, je tiens à remercier très sincèrement Mesdames Corinne Roqueta, Catherine Fouache et Messieurs Serge Comini et Jean-Michel Roturier, pour nos discussions et votre participation active à ce travail; Monsieur Jean-Marc Grossel, pour sa patience, son enthousiasme et son expérience dont il m'a fait bien souvent profiter; ainsi que Danièle, Agnès, Marie-Noëlle et Monique pour leur aide précieuse.

Au laboratoire de Chimie Biologique, mes remerciements vont tout naturellement aux membres de l'ex-107 encore au laboratoire: Calliope, Didier, Frédéric, Ossarath et Tim, et ceux dispersés maintenant un peu partout en France et à l'étranger: Françoise, Nelly, Guy, Philou, Thierry et Willy. Quant à Yves Leroy, Jérôme Lemoine et Guy Ricart, je n'oublie pas l'aide que vous m'avez apportée et tout ce temps passé avec vous qui m'a permis de profiter de vos compétences respectives.

Un merci tout particulier, au Professeur Stéphane Bouquelet pour m'avoir fait découvrir la recherche au cours du stage du DEA. Merci à Steph, Eliane, Colette, Isabelle et Fred, pour votre soutien, votre gentillesse et votre bonne humeur. Soyez assurés de ma plus sincère amitié.

Pour cette année 1997, passée dans le laboratoire du Professeur Geneviève Spik, où je me suis rapidement intégrée dans une équipe chaleureuse et dynamique: merci à tous. Merci à Annick, Bernadette et Marie-Christine, soyez assurées de mon amitié.

Merci à Catherine, Fred, Christophe et Mathieu pour mes progrès en informatique.

Nombreux sont encore les membres du Laboratoire de Chimie Biologique qui par leur soutien, leurs conseils, leur compétence et leur amitié ont permis l'aboutissement de ce travail. Recevez mes sincères remerciements.

Ce travail a fait l'objet des communications écrites suivantes:

**DERENSY-DRON D., J. LEMOINE, Ph. LOOTEN et B. DOMON**

Etude de la répartition glucidique de polydextroses par MALD/MS

XVI<sup>èmes</sup> journées du Groupe Français des Glucides, L'isle sur la Sorgue, 20-24 mai 1996

**DERENSY-DRON D., J. LEMOINE, B. DOMON, Ph. LOOTEN et A. VERBERT**

Caractérisation de polymères glucidiques de type Polydextrose en mode désorption laser (MALD/MS)

14<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Lille, 15-18 septembre 1997.

**DERENSY-DRON D., J. M. GROSSEL, G. RICART, Y. LEROY, B. DOMON, Ph. LOOTEN and A. VERBERT**

Comparison of desorption-ionization by MALD and ES mass spectrometry

9<sup>th</sup> Joint Meeting of the nederlands society for Glycobiology, the groupe lillois de Glycobiologie, the studiennguppe glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie and Molekularbiologie, Lille, 24-25 novembre 1997.

## LISTE DES ABREVIATIONS

2-AB	:	2-aminobenzamide
anhydroglc	:	anhydroglucose
CI	:	ionisation chimique
DHB	:	acide 2,5 dihydroxybenzoïque
DP	:	degré de polymérisation
$\overline{DP}$	:	degré de polymérisation moyen
DP <sup>2</sup>	:	espèce moléculaire dichargée [M+2Na] <sup>2+</sup> du DP correspondant
EI	:	impact électronique
ES	:	électrospray
FAB	:	fast atom bombardment
FCC	:	<i>food Chemical Codex</i>
GC	:	chromatographie en phase gazeuse
glc	:	glucose
HMF	:	5-hydroxyméthyl 2-furfural
HPLC	:	chromatographie liquide à haute performance
I	:	indice de polydispersité
IR	:	infrarouge
keV	:	kilo électron volt
kV	:	kilo volt
MALD	:	<i>matrix assisted laser desorption</i>
$\overline{Mn}$	:	masse moléculaire moyenne en nombre
$\overline{Mp}$	:	masse moléculaire moyenne en poids
MS	:	spectrométrie de masse
MW	:	méga watt (10 <sup>6</sup> )
P316	:	1,4 naphthalène dipropionate
PAD	:	<i>pulsed amperometric detection</i>
PMAA	:	alditols acétates partiellement acétylés
PSD	:	<i>post source decay</i>
p/v	:	poids / volume
RMN	:	résonance magnétique nucléaire
TMS	:	triméthylsilylé
v/v	:	volume / volume

**SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>GENERALITES - CHAPITRE 1. Les polymères glucidiques</b>	<b>3</b>
<b>1. 1. Les polydextroses</b>	<b>3</b>
1. 1. 1. Historique	3
1. 1. 2. Définition et normes du Food Chemical Codex	5
1. 1. 3. Propriétés	5
1. 1. 4. Applications	8
1. 1. 5. Métabolisme	9
<b>1. 2. Problématique des "anhydrosucres"</b>	<b>12</b>
1. 2. 1. Définitions et classification	12
1. 2. 2. Origines	12
1. 2. 3. Propriétés et applications	17
<b>1. 3. Les produits de dégradation des sucres en milieu acide</b>	<b>19</b>
1. 3. 1. La glycosidation	20
1. 3. 2. La formation de furanes	20
1. 3. 3. Produits colorés et humines	20
<b>1. 4. Les dérivés glucidiques homologues</b>	<b>22</b>
1. 4. 1. Les maltodextrines	22
1. 4. 2. Oligosaccharides divers	23
<b>GENERALITES - CHAPITRE 2. Méthodes d'investigations</b>	<b>24</b>
<b>2. 1. Caractérisation des polymères glucidiques</b>	<b>24</b>
2. 1. 1. Définitions	24
2. 1. 2. Détermination de la masse moléculaire et distribution glucidique	28
<i>Cryométrie</i>	28

<i>Résonance magnétique nucléaire</i>	28
<i>Chromatographie de filtration sur gel</i>	29
<i>Spectrométrie de masse</i>	30
<b>2. 2. Analyse structurale des polymères glucidiques par spectrométrie de masse</b>	<b>33</b>
2. 2. 1. Techniques de désorption	33
Ionisation par <i>fast atom bombardment</i> (FAB)	33
Ionisation laser assistée par une matrice (MALD)	36
Ionisation par électrospray (ES)	38
2. 2. 2. Application à l'analyse des polymères glucidiques	43
Oligosaccharides peracétylés et perméthylés	43
Oligosaccharides dérivés par amination réductive	45
<b>2. 3. Etude structurale détaillée</b>	<b>48</b>
2. 3. 1. Résonance magnétique nucléaire et infrarouge	48
2. 3. 2. Hydrolyse totale et dégradation partielle	50
2. 3. 3. Analyse par GC/MS des produits de dégradation	51
<i>Ionisation par impact électronique (EI)</i>	51
<i>Ionisation chimique (CI)</i>	52
2. 3. 4. Méthodes de méthylation	53
2. 3. 5. Méthode de Lindberg	54
2. 3. 6. Dégradation de Smith	60
2. 3. 7. Mise en évidence des groupes endogènes	60
<b>RESULTATS ET DISCUSSION - CHAPITRE 3. Mise au point de méthodologies sur des oligosaccharides de référence en vue d'une caractérisation par spectrométrie de masse</b>	<b>63</b>
<b>3. 1. Caractéristiques d'une étude quantitative par spectrométrie de masse</b>	<b>63</b>
3. 1. 1. Limite de détection	64
3. 1. 2. Etalonnage externe	64
3. 1. 3. Sources d'erreur et étalonnage interne	65
3. 1. 4. Etude statistique et expression des résultats	66
<b>3. 2. Préparation des échantillons</b>	<b>66</b>

---

3. 2. 1. Oligosaccharides et maltodextrines natifs	67
3. 2. 2. Oligosaccharides et maltodextrines méthylés	67
3. 2. 3. Oligosaccharides réduits	67
<b>3. 3. Analyses par FAB</b>	<b>68</b>
3. 3. 1. Analyses de maltooligosaccharides	68
3. 3. 2. Analyses de polydextroses	70
3. 3. 3. Conclusion	72
<b>3. 4. Analyses par électrospray</b>	<b>73</b>
3. 4. 1. Analyses du mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7	73
Oligosaccharides natifs	73
Oligosaccharides méthylés	78
Oligosaccharides réduits	80
Oligosaccharides réduits et méthylés	82
3. 4. 2. Analyses de maltodextrines	87
Maltodextrines natives	88
Maltodextrines perméthylées	88
3. 4. 3. Conclusion	93
<b>3. 5. Analyses par MALD</b>	<b>95</b>
3. 5. 1. Analyses du mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7	95
Oligosaccharides natifs	96
Oligosaccharides perméthylés	99
3. 5. 2. Analyses de maltodextrines	101
Maltodextrines natives	101
Maltodextrines perméthylées	101
3. 5. 3. Conclusion	106
<b>3. 6. Discussion</b>	<b>107</b>
<b>3. 7. Conclusion générale</b>	<b>114</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION - CHAPITRE 4 . Caractérisation de polymères glucidiques de type polydextrose</b>	<b>118</b>
<b>4. 1. Etudes préliminaires</b>	<b>118</b>

---

4. 1. 1. Chromatographie de filtration sur gel	118
4. 1. 2. Cryométrie	121
4. 1. 3. Résonance magnétique nucléaire	124
<b>4. 2. Caractérisation par spectrométrie de masse</b>	<b>128</b>
4. 2. 1. Analyses qualitatives par MALD et ES	128
Analyses par MALD	128
Analyses par ES	134
4. 2. 2. Analyses semi-quantitatives par MALD et ES	139
Analyses par MALD	139
Analyses par ES	139
<b>4. 3. Discussion</b>	<b>141</b>
<b>4. 4. Conclusion</b>	<b>144</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION - CHAPITRE 5. Analyse structurale des polymères glucidiques</b>	<b>147</b>
<b>5. 1. Etudes préliminaires</b>	<b>147</b>
5. 1. 1. Composition chimique et normes du Food Chemical Codex	147
Tests d'identification	148
Composition chimique	148
5. 1. 2. Infrarouge et Résonance magnétique nucléaire	149
Infrarouge	149
RMN du proton	151
<b>5. 2. Analyse structurale par spectrométrie de masse</b>	<b>154</b>
5. 2. 1. Analyse structurale globale	155
Composition en monosaccharides par phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés	155
Mise en évidence du 5-(hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde et de l'acide lévulinique	157
Inventaire des points de branchement (GC et GC/MS en EI)	168
Estimation du degré de ramification par analyse des éthylglucosides perméthylés	171

---

Conclusion	178
5. 2. 2. Fractionnements et analyse structurale détaillée	180
Fractionnement par précipitation éthanolique	180
Fractionnement par chromatographie liquide à haute performance sur colonne Diol	184
<i>Analyse de la fraction Diol D<sub>1</sub> enrichie en DP2 glucose-anhydroglucose</i>	187
<i>Analyse de la fraction Diol D<sub>2</sub> enrichie en DP2 glucose-glucose et glucose-sorbitol</i>	191
Fractionnement par amination réductive des oligosaccharides réducteurs	202
<i>Présentation de la stratégie</i>	202
<i>Rendement de la réaction d'amination réductive</i>	204
<i>Fractionnement des polymères glucidiques</i>	207
<i>Régénération de la fonction aldéhydique des (glc)<sub>n</sub>- anhydroglucose</i>	210
<i>Régénération de la fonction aldéhydique des (glc)<sub>n</sub>-alditols</i>	213
5. 3. Discussion	214
5. 4. Conclusion générale	217
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>221</b>
<b>APPENDICE TECHNIQUE</b>	<b>227</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>238</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>247</b>

---

## **Introduction**

---

## INTRODUCTION

Les glucides sont des molécules très importantes de notre alimentation et représentent environ 50% de notre apport calorique quotidien. Dans les pays industrialisés, avec l'augmentation du niveau de vie, la part de sucre « visible », tels que le pain et la pomme de terre, diminue au détriment d'une consommation excessive de sucres « cachés » tels que le saccharose et les dérivés de l'amidon. Dans ce dernier cas, il s'agit essentiellement d'auxiliaires de fabrication rendus nécessaires pour des gains de production ou pour répondre aux goûts nouveaux des consommateurs. En effet, généralement les gens associent au mot sucre, le goût sucré et le plaisir de consommer des aliments en contenant, comme les gâteaux et les glaces. Pourtant, les glucides apportent également le volume, la texture et la tenue en bouche, sans lesquels la préparation de ces aliments serait impossible. Malheureusement, pour les personnes soucieuses de leur alimentation, le plaisir de consommer le sucre dans les aliments s'accompagne des calories correspondantes.

Depuis quelques années, un certain nombre de désordres métaboliques et de maladies ont été corrélés à l'augmentation de la consommation en glucides, en particulier : les caries dentaires, l'obésité, les maladies cardio-vasculaires et le diabète précoce. Le saccharose et les autres glucides ainsi qu'une augmentation de la sédentarité sont donc responsables d'un bon nombre de ces maladies.

Pour pallier ces inconvénients tout en conservant le plaisir du goût sucré, de nouveaux produits sont apparus sur le marché afin de réduire la consommation en glucides et en calories: les substituts de sucre basse-calorie. Ces produits sont devenus un centre d'intérêt en industrie agro-alimentaire avec l'expansion de l'alimentation allégée et ils ont été utilisés dans des campagnes de sensibilisation de contrôle du poids. En effet, l'utilisation de plus en plus importante d'édulcorants intenses (Aspartame, Acésulfame-K...) a induit le développement d'agents de charge acaloriques ou plutôt faiblement caloriques, très solubles dans l'eau, non colorés, sans goût sucré, mais qui donnent la même texture et la même tenue en bouche que le produit non allégé. Les substituts de sucre basse-calorie sont donc destinés à jouer le rôle de « ballast » dans les formules alimentaires.

Les industriels producteurs de ces substituts proposent une large gamme de produits, d'origines différentes, dont des oligosaccharides extraits de végétaux, d'autres obtenus par synthèse enzymatique à l'aide de glycosyltransférases ou encore par hydrolyse enzymatique contrôlée de polysaccharides ainsi que des polymères de type polydextrose. Ces derniers,

obtenus par polymérisation chimique en présence d'un catalyseur, ont fait l'objet de notre étude.

Plus précisément, les produits concernés ont été un polyglucose Roquette fabriqué par la société Roquette et le polydextrose Pfizer A, produit par la société Pfizer. Le polyglucose a été obtenu par condensation de glucose uniquement alors que le polydextrose est issu de la condensation de glucose et de sorbitol. L'appellation de ces produits appartient davantage au registre commercial que scientifique.

Les objectifs de notre travail ont été multiples. Nous avons eu pour mission de combler les lacunes représentées par une littérature très ancienne et pauvre concernant la structure des produits ainsi que de lever l'ambiguïté concernant les masses moléculaires de la distribution glucidique. Pour cela, le but premier de notre travail a été de caractériser les polymères glucidiques, polydextrose et polyglucose, selon trois axes de recherche :

(i) la caractérisation de la distribution glucidique, par estimation des masses moléculaires en terme de masses moléculaires moyennes et de leur degré de polymérisation moyen,

(ii) l'analyse structurale globale par détermination de la nature des substitutions des monomères et la recherche des produits issus de réactions de brunissement non enzymatiques,

(iii) l'élucidation de la structure primaire des oligosaccharides dont la composition en monosaccharides, la nature des liaisons, la position des liaisons et leur anomérie.

A chaque étape, les investigations ont été menées en premier lieu par des techniques dites conventionnelles puis par les différentes techniques de spectrométrie de masse dont la *Matrix Assisted Laser Desorption* (MALD), l'électrospray (ES) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).

L'ensemble des informations alors recueillies ont été mises à profit pour instruire le débat structure / fonction de ces substituts basse-calorie. Par ailleurs, tout au long de nos investigations, nous avons cherché à développer des moyens de contrôle afin de suivre la fabrication des produits.

Avant d'exposer les résultats obtenus, nous présenterons quelques généralités concernant le polydextrose et résumerons les techniques d'étude des oligo- et polysaccharides.

---

## **Chapitre 1**

### **Généralités**

---

## CHAPITRE 1. Les polymères glucidiques

### 1. 1. Les polydextroses

Avant d'aborder l'étude de la distribution et l'analyse structurale des polymères glucidiques, il est important de connaître l'historique de la réaction de condensation encore appelée réaction de réversion chimique sur laquelle est basée la synthèse du polydextrose et du polyglucose.

#### 1. 1. 1. Historique

La réaction de condensation est apparue dès 1872, lorsque Musculus observe la formation de " dextrine-like " par action d'un acide minéral sur du glucose. En 1890, Fischer isole pour la première fois l'osazone de l'isomaltose à partir d'une solution de glucose à 25% mise en présence d'acide chlorhydrique concentré. En 1953, Fetzer *et al.* étudient la réaction de condensation du D-glucose et la formation d'un disaccharide majoritaire, l'isomaltose, en mélange avec le gentiobiose et le maltose. Les auteurs ont observé l'apparition de saccharides de plus haut poids moléculaire lorsque la quantité d'eau du milieu réactionnel est diminuée. Les disaccharides, trisaccharides et oligosaccharides supérieurs ainsi formés sont issus de la condensation par perte d'eau (Thompson *et al.* 1953). La réaction de condensation porte aussi le nom de réaction de réversion car elle se produit couramment lors de l'hydrolyse acide de polysaccharides et nombreuses sont les références faisant mention, dans ce cas, de la formation d'une liaison majoritaire en  $\alpha(1-6)$  (Thompson *et al.* 1954).

Mora et Pacsu (US Patent Office n° 2 719 179 délivré le 27 septembre 1955) décrivent un procédé de fabrication de polysaccharides plus lourds et fortement branchés par chauffage de glucose ou de maltose en milieu liquide en présence d'un catalyseur acide (acide chlorhydrique, acide phosphorique, acide sulfurique, chlorure d'aluminium). Les masses moléculaires déterminées des polymères vont de 2.500 à 1.000.000 Da. Elles sont obtenues par dialyse ou par précipitation au méthanol. Ces polyglucoses sont fortement colorés. La neutralisation du milieu réactionnel par une solution alcaline et des étapes de purification sont indispensables pour éliminer l'acidité et isoler le polymère. Ces polyglucoses étaient initialement destinés à être utilisés comme substituts de plasma sanguin ou comme polysaccharides immunologiquement actifs mais certainement pas comme additif alimentaire à cause notamment de leur purification trop coûteuse.

En 1968, Hans H. Rennhard de la société Pfizer (brevet n° 1 538 007 délivré le 22 juillet 1968) améliore le brevet précédent en proposant un procédé de fabrication de polyglucose et de polymaltose solubles et insolubles, utilisables comme aliments diététiques. Le glucose ou le maltose sont présents à l'état fondu anhydre et le catalyseur utilisé est alors autorisé pour une application alimentaire. Il s'agit d'un acide organique polycarboxylique non volatil qui agit comme catalyseur de polymérisation et comme agent de réticulation transversale. Les acides les plus utilisés sont les acides, citrique, fumarique, tartrique, succinique, maléique, adipique ou leurs anhydrides. Ces améliorations évitent une étape ultérieure de purification du produit avant son incorporation dans les aliments comme succédanés non nutritifs. Deux types de polymères sont obtenus: des polyglucoses ou polymaltoses solubles, de poids moléculaire moyen de 3000 à 180.000 Da, pouvant remplacer le sucre dans les préparations alimentaires quand l'effet édulcorant du sucre est obtenu par un édulcorant artificiel et des polyglucoses et polymaltoses insolubles, de poids moléculaire moyen de 3000 à 360.000 Da, pouvant remplacer la farine ou l'amidon. Dans les deux cas, le catalyseur est incomplètement incorporé au polymère. Il est probable que dans les polymères solubles l'acide soit simplement estérifié avec une seule molécule de polymère alors que pour les polymères insolubles l'acide peut servir d'agent de réticulation transversale par estérification entre les différentes molécules de polymères. Les deux types de polymères peuvent être synthétisés simultanément avec possibilité de produire l'un ou l'autre séparément en ajustant la concentration initiale en acide, la durée et la température de réaction de polycondensation.

En 1972, Rennhard décrit de nouveaux produits alimentaires permettant de réduire l'apport en glucides et/ou en calories. Le but de l'invention est toujours de produire des succédanés non nutritifs, non toxiques, permettant la fabrication économique et rapide de produits alimentaires donnant les mêmes propriétés organoleptiques que les produits conventionnels (London Patent Office N°1 262 842 délivré le 9 février 1972). L'innovation de ce brevet est l'introduction dans le milieu réactionnel de 5 à 20% du poids sec de polyols alimentaires tels que le sorbitol, le glycérol, l'érythritol, le xylitol, le mannitol ou le galactitol. A l'issue de la polycondensation, environ 90% du polyol est chimiquement incorporé dans le polymère et il est fixé à l'extrémité réductrice de la molécule. Cet additif implique, au niveau des propriétés rhéologiques, une diminution de la viscosité du milieu réactionnel pendant la mise en oeuvre. Il améliore le goût et diminue la coloration du produit. D'autre part, le sorbitol permet le contrôle de la synthèse dans les hautes masses moléculaires et empêche la formation de la fraction insoluble (Allingham, 1982).

Le terme **polydextrose** a été introduit par Rennhard de la société Pfizer, en 1973, à l'issue d'un long programme de synthèse de polysaccharides non caloriques à finalité alimentaire (US Patent Office n° 3 766 156 délivré en 1973 et n° 3 8769 794 délivré en 1975). Après que le glucose et d'autres monosaccharides ainsi que tous les polyols alimentaires et des acides carboxyliques aient été intégrés dans des formulations selon des ratios très divers, une large gamme de conditions opératoires, de pression et de température ont été testées. Les meilleurs résultats ont été obtenus à partir d'une polymérisation thermique sous vide d'un mélange fondu anhydre de glucose en présence d'un catalyseur acide, l'acide citrique, et d'une faible proportion de sorbitol qui joue un rôle de plastifiant. Ainsi le polydextrose, fabriqué à partir d'un mélange glucose/sorbitol/acide citrique dans un rapport 89/10/1, présente les propriétés recherchées c'est-à-dire une absence de pouvoir sucrant, une bonne solubilité et une bonne stabilité.

#### 1. 1. 2. Définition et normes du Food Chemical Codex

Le polydextrose est décrit par le Food Chemical Codex (FCC, 4<sup>ème</sup> édition, 1996) comme un polymère obtenu par condensation de D-glucose possédant des liaisons aléatoires ainsi que des branchements avec le sorbitol et l'acide citrique (Figure 1). Les liaisons (1-6) sont prédominantes mais d'autres liaisons sont aussi présentes. Le produit contient une faible proportion de monomères résiduels dont le glucose, le sorbitol, ainsi que des traces d'acide citrique. De plus, de très faibles quantités de 1,6 anhydro-D-glucose encore appelé levoglucosan et de 5-hydroxyméthyl 2-furfural (HMF) sont présentes, résultant de la déshydratation du glucose. Le polydextrose se présente sous forme d'une poudre amorphe de couleur blanc cassé à marron clair, très soluble dans l'eau. La solution de polydextrose possède un pH légèrement acide qui peut être neutralisé. Les exigences à satisfaire pour répondre à la définition du polydextrose ainsi que les tests et techniques utilisés pour vérifier ces critères ont été résumés dans le Tableau 1.

Le polydextrose est autorisé et utilisé en France depuis l'arrêté du 4 juillet 1987 ainsi qu'en Europe, aux Etats-Unis, au Canada et au Japon.

#### 1. 1. 3. Propriétés

Le polydextrose est un agent de charge unique, qui grâce à sa structure chimique possède sur le plan nutritionnel un faible pouvoir calorifique d'environ 1 kcal/g (soit 4,18 kJ/g). Ne

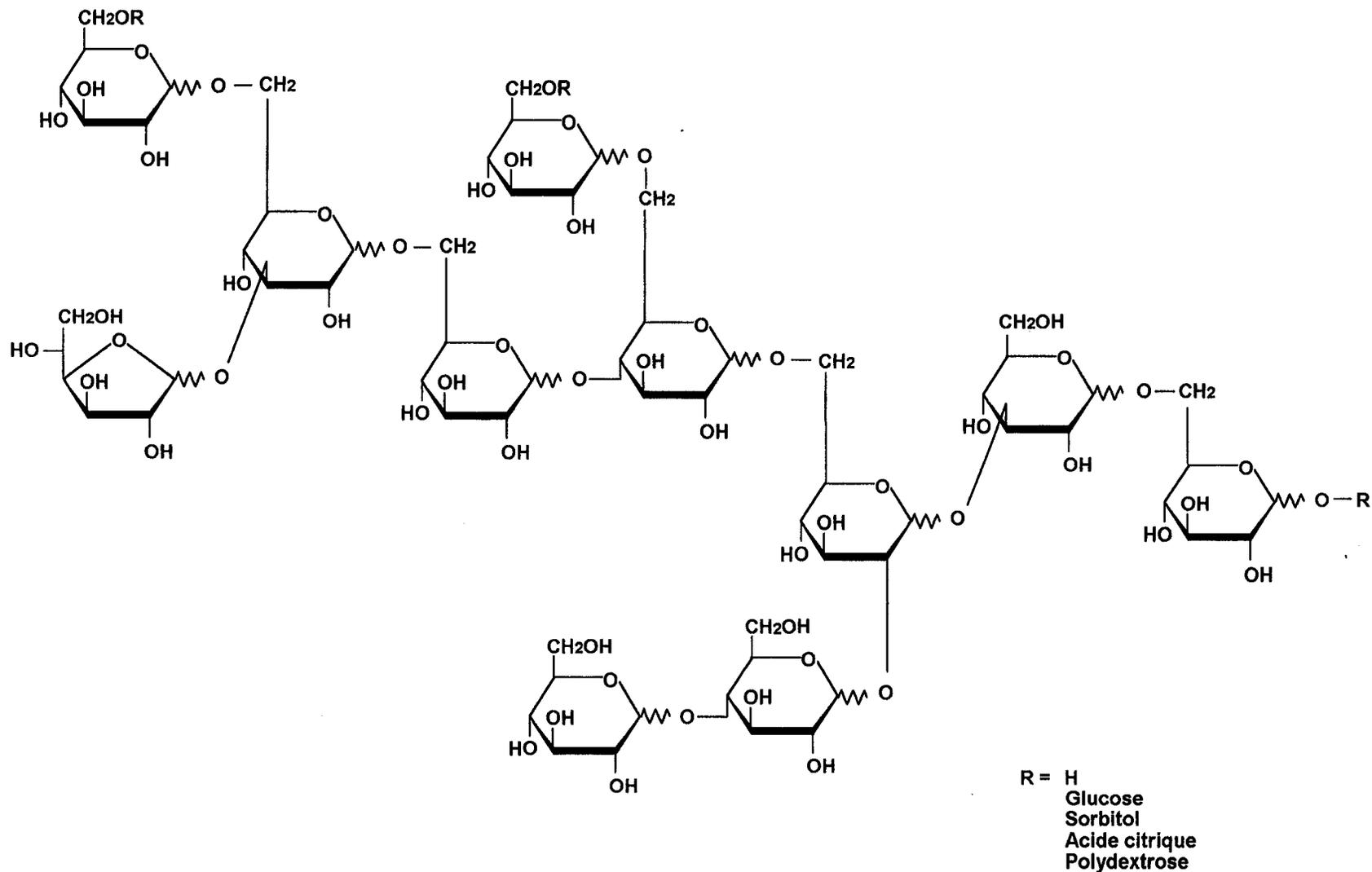


Figure 1: Structure hypothétique d'un polydextrose (D'après Allingham, Pfizer)

	<b>Exigences</b>	<b>Tests</b>
<b>polydextrose</b>	au moins 90,0 % du polymère	phénol sulfurique
<b>1,6 anhydro-D-glucose</b>	inférieur à 4,0 %	chromatographie en phase
<b>glucose + sorbitol</b>	inférieur à 6,0 %	gazeuse
<b>eau</b>	inférieur à 4,0 %	titrimétrie (Karl Fischer)
<b>distribution de masse moléculaire</b>	< 22.000	chromatographie de filtration sur gel par HPLC (Ultrahydrogel 250 Å) standards: glucose, stachiose et pullulans (5.800, 23.700 et 100.000)
<b>métaux lourds</b>	inférieur à 5 mg / kg de polymère	
<b>plomb</b>	0,5 mg/kg	
<b>5-hydroxyméthylfurfural</b>	inférieur à 0,1 %	absorbance à 283 nm
	<b>pH de la solution à 10 %</b>	<b>Cendres</b>
<b>Polydextrose non traité</b>	supérieur à 2,5	inférieure à 0,3 %
<b>Polydextrose neutralisé / décoloré</b>	entre 5,0 et 6,0	inférieure à 2 %

Tableau 1 : Exigences requises pour le polydextrose par le Food Chemical Codex (4<sup>ème</sup> édition, mars 1996) et les techniques analytiques associées.

possédant pas de pouvoir sucrant, il a l'avantage de remplacer le sucre et les matières grasses afin de réduire l'apport calorique d'aliments sans en changer ni le goût, ni la texture.

Le polydextrose est très soluble dans l'eau (jusqu'à 80%) et insoluble dans l'éthanol. La poudre est très stable pendant de longues périodes à des températures de 25, 45 ou 60°C. On observe pourtant, à des températures supérieures, une apparition de coloration. Ainsi, pour cette raison, le stockage dans un endroit sec et frais est recommandé.

La viscosité du polydextrose en solution est plus élevée que celle d'une solution de saccharose à même concentration et cette propriété permet de donner du corps aux aliments.

Le polydextrose possède une température de ramollissement supérieure à 130°C. Après refroidissement, il possède l'apparence d'un verre transparent avec une texture cassante comparable aux bonbons de sucre cuit. Contrairement au saccharose, le polydextrose ne cristallise pas.

Une solution de polydextrose montre une diminution du point de congélation plus faible que celle d'une solution de saccharose de concentration équivalente. Cette propriété est due à la masse moléculaire plus élevée du polydextrose; elle permet d'obtenir le point de congélation désiré pour des glaces ou des sorbets (Käch, Pfizer, 1992).

Le pouvoir sucrant du polydextrose est de 0,3 (référence saccharose = 1) et par conséquent, il peut améliorer les qualités organoleptiques des préparations alimentaires sans apporter un goût sucré.

#### 1. 1. 4. Applications

Le polydextrose contribue de façon importante à donner un goût agréable et à maintenir les qualités texturales de l'aliment sans ajouter de note sucrée. Grâce à sa faible valeur calorique, il participe comme agent de charge au développement des aliments basse-calorie et à calories réduites.

Pour le formulateur, le polydextrose présente des aspects pratiques: au cours de la préparation d'un produit, il favorise l'écoulement des ingrédients dans le mélange sec et diminue la formation de grumeaux. Le polydextrose apporte aussi de la rondeur en bouche en augmentant la viscosité des préparations. Il est donc utilisé comme agent texturant pour contrôler, modifier ou améliorer la texture des préparations alimentaires (Käch, Pfizer, 1992).

Le polydextrose agit comme un agent humectant qui évite les variations indésirables de teneur en eau des aliments pendant notamment les périodes prolongées de conservation. Il

apporte aussi une onctuosité agréable à des gâteaux grâce au maintien d'un taux d'humidité plus élevé (Käch, Pfizer, 1992).

Les produits susceptibles de contenir du polydextrose sont les suivants: les crèmes glacées et sorbets, les desserts congelés, les pâtisseries et gâteaux, les confitures, les desserts lactés, les boissons, les fourrages et enrobages, les puddings, la confiserie (bonbons de type sucre cuit, pâtes molles), le chocolat (tablettes et barres), les barres céréalières, les mélanges pour préparations instantanées et les sauces et mayonnaises (Pfizer).

Il est utilisé, en fonction de la législation du pays, dans différents types de produits alimentaires où il permet une réduction de 25 à 60 (voire même 90% ) de l'apport calorique en remplaçant le sucre, la farine ou les lipides.

### 1. 1. 5. Métabolisme

Des études utilisant des polydextroses uniformément marqués par le [ $^{14}\text{C}$ ] ont démontré que l'utilisation du polydextrose chez le rat (Figdor et Rennhard, 1981) et chez l'homme (Figdor et Bianchine, 1983) est au maximum de 25% de celle du glucose. La valeur calorique du polydextrose est de 1 kcal/g (4,1868 kJ/g) comparée à celle des sucres (4 kcal/g soit 16,75 kJ/g) et les matières grasses (9 kcal/g soit 37,68 kJ/g).

Cette valeur faible est due à la faible absorption gastro-intestinale et sa forte résistance à la dégradation par les bactéries du côlon (Figdor et Bianchine, 1983). En effet, chez l'homme sain, les enzymes intestinales et pancréatiques sont incapables de digérer le polydextrose. Après ingestion (Figure 2), la majeure partie (60%) est excrétée intacte dans les fèces. La partie complémentaire est utilisée par la microflore intestinale. Cette microflore est constituée principalement de bactéries anaérobies produisant différents types de glycosidases capables d'hydrolyser la plupart des liaisons glucosidiques. Les monosaccharides ainsi produits sont métabolisés par les bactéries qui synthétisent des acides gras à courtes chaînes (acétate, propionate et butyrate), de l'hydrogène, du dioxyde de carbone et du méthane. Ces derniers sans valeur nutritive sont émis sous forme de flatulences ou transportés vers les poumons afin d'être expirés. Quant aux acides gras volatils, une partie est utilisée par les bactéries pour leur propre croissance, une autre est éliminée dans les selles, mais la plus grande partie est absorbée par la muqueuse colique et transportée par la veine porte jusqu'au foie. Cette fraction est donc énergétique pour l'hôte. Le polydextrose est donc digéré comme ce que l'on appelle les " fibres ".

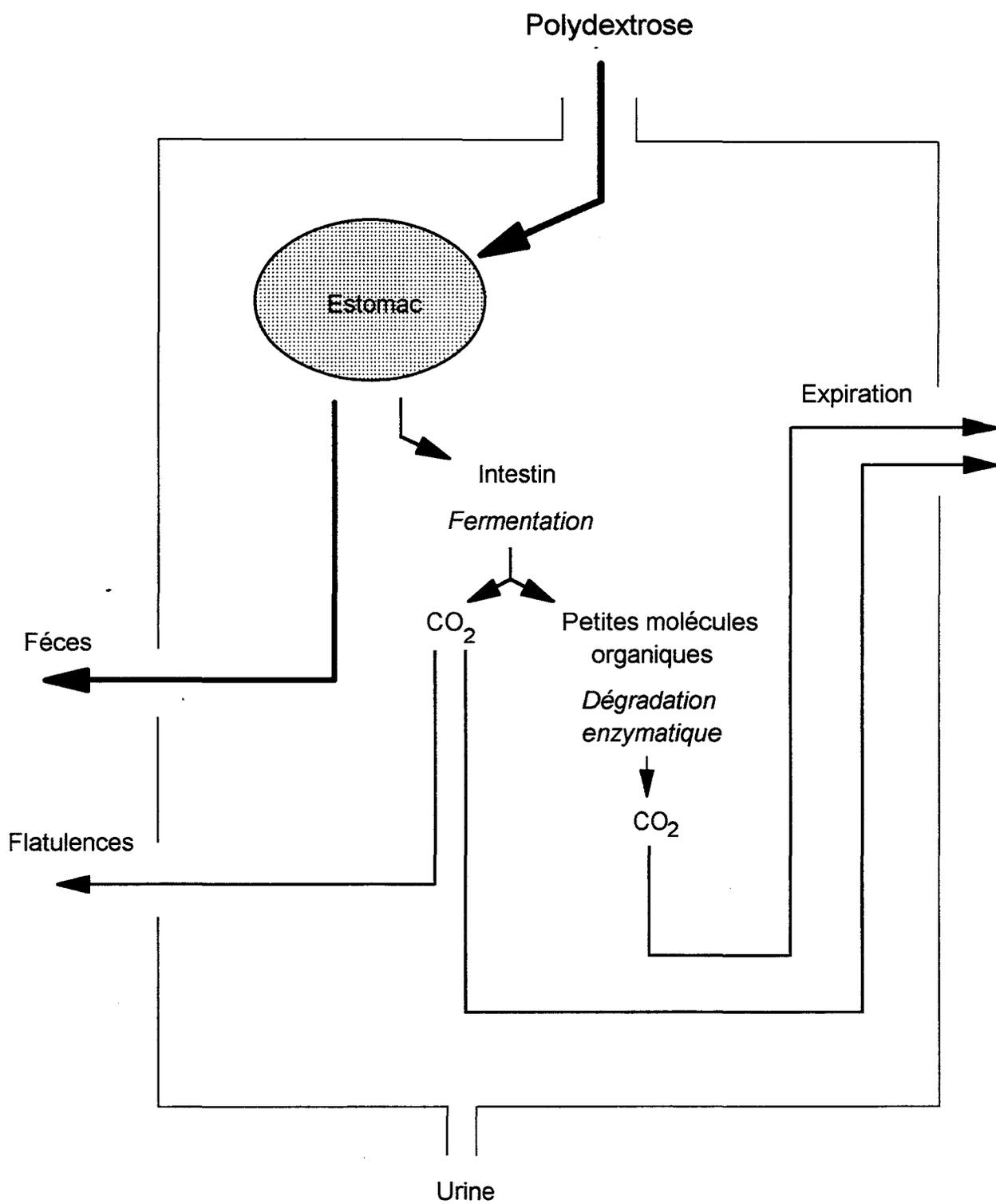


Figure 2: Résumé du métabolisme du polydextrose chez l'Homme (D'après Murray, 1988)

Une fraction des molécules monomériques résiduelles, telles que le glucose, le sorbitol et le 1,6 anhydroglucose, est utilisée de la façon suivante: l'absorption du glucose est réalisée par traversée de la membrane de la cellule épithéliale intestinale grâce à un transporteur  $\text{Na}^+$  dépendant. Le glucose emprunte alors la veine porte jusqu'au foie où il va être métabolisé. La glycolyse ou voie de Embden-Meyerhof, dont la première étape, extra-mitochondriale, conduit à une oxydation du glucose préalablement phosphorylé en glucose-6-P en acide pyruvique. La seconde étape intra-mitochondriale permet l'oxydation totale de l'acide pyruvique en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  grâce au cycle de Krebs. En parallèle de la voie de la glycolyse, le glucose peut emprunter la voie de Dickens-Horecker encore appelée shunt des hexoses-phosphate qui produit des pentoses-phosphate, du NADPH et de l'énergie. L'oxydation du glucose fournit donc une grande partie de l'énergie dont nous avons besoin sous forme d'ATP. En outre, les atomes de carbone du glucose se retrouvent dans un grand nombre de composés comme les aminoacides, les acides gras, les stérols car le métabolisme glucidique fait partie du métabolisme cellulaire et toutes ces réactions sont intimement liées.

Le 1,6 anhydro-D-glucose est transformé en glucose par l'action de l'acidité de l'estomac. L'absorption des monosaccharides hydrogénés et notamment celui du sorbitol s'effectue par diffusion passive. Le sorbitol est ensuite transformé en fructose par la sorbitol déshydrogénase, enzyme ayant pour cofacteur le  $\text{NAD}^+$ , puis en fructose-1-phosphate par une kinase. Ces réactions permettent au 1,6 anhydroglucose et au sorbitol d'intégrer le métabolisme du glucose.

Il a été montré que le polydextrose n'empêche ni l'absorption, ni l'utilisation des vitamines, des minéraux et des acides aminés essentiels (Scrimshaw et Young, 1977, Pfizer.).

Dans le cas d'un diabète de type II, non insulino-dépendant, le polydextrose peut être préconisé pour l'alimentation des diabétiques afin de réduire l'apport en glucose. Il n'affecte ni le taux de glucose ni le taux d'insuline dans le sang (Mehnert *et al.*, 1982).

Des études *in vitro* ont montré que le polydextrose n'est pas utilisé par *Streptococcus mutans*, la bactérie responsable de la formation de la plaque dentaire et de l'acide provoquant des lésions de l'émail. Le polydextrose ne favorise donc pas la formation de caries dentaires (Muehleman, 1980).

Le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1995) a décrété que la dose journalière autorisée (DJA) du polydextrose était non spécifiée en raison de la non toxicité du produit. En effet, le polydextrose peut être consommé en grande quantité pendant de longues périodes sans provoquer de nuisance. Il entraîne moins de troubles gastro-

intestinaux que les nombreux polyols utilisés par l'industrie alimentaire, tel que le sorbitol (Raphan, 1975). Chez l'adulte, la dose moyenne de polydextrose ayant un effet laxatif est d'environ 90 g/jour contre 70 g/jour pour le sorbitol. Chez l'enfant, la quantité de 1 g/kg/jour de polydextrose est la dose maximale étudiée, elle provoque seulement une augmentation des flatulences (Raphan, 1975).

## 1. 2. Problématique des "anhydrosucres"

Nous avons vu dans le paragraphe précédent la présence du monomère de 1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucopyranose comme molécule résiduelle dans le polydextrose. Ce chapitre va nous permettre d'aborder la structure et les propriétés physico-chimiques de résidus "anhydrosucres" que nous retrouverons au cours de notre étude.

### 1. 2. 1. Définitions et classification

Le terme couramment employé d' "anhydrosucre" regroupe les dérivés de sucres ayant subi une perte intramoléculaire d'une ou de deux molécules d'eau (voir pour revue: Guthrie, 1972). Ces sucres ont été différenciés en deux classes distinctes (Figure 3):

- *les glycosans*, résultant de l'élimination d'une molécule d'eau entre une fonction hydroxyle et la fonction hémiacétalique d'une même molécule: ce sont des acétals internes (voir pour revue: Peat, 1946; Cerny *et al.*, 1977),

- *les anhydrosucres*, issus de l'élimination d'une molécule d'eau entre deux fonctions hydroxyles d'une même molécule, mais aucun des deux hydroxyles n'est porté par le carbone anomérique, ce sont donc des éthers internes.

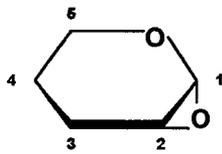
### 1. 2. 2. Origines

#### Les glycosans

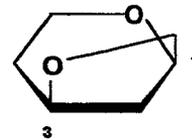
Seuls les glycosans issus de monomères non substitués seront détaillés dans ce paragraphe.

Le 1,2 anhydro- $\alpha$ -D-glucopyranose: Le 1,2 anhydro- $\alpha$ -D-glucopyranose résulte de la pyrolyse (décomposition chimique sous la seule action de la chaleur) de l' $\alpha$ -D-glucose à 150°C sous pression réduite (Pictet *et al.*, 1920a; Cramer *et al.*, 1922).

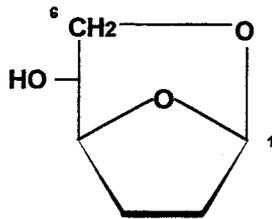
Le 1,3 anhydro- $\beta$ -D-galactopyranose: Un seul composé de ce type a été mis en évidence, le 1,3 anhydro- $\beta$ -D-galactopyranose, issu de la pyrolyse du galactose.



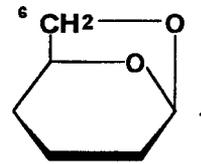
1,2 anhydropyranose



1,3 anhydropyranose

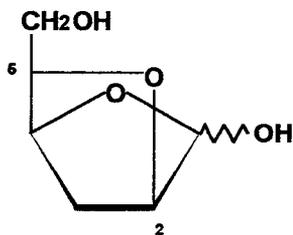


1,6 anhydrofuranose

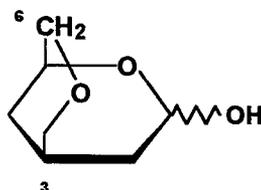


1,6 anhydropyranose

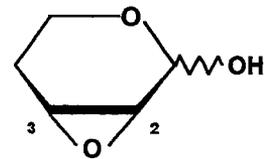
### Les glycosans



2,5 anhydrofuranose  
Type hydrofuranol oxyde



3,6 anhydropyranose  
Type butylène oxyde



2,3 anhydropyranose  
Type éthylène oxyde

### Les anhydrosucres

Figure 3: Classification et structure des principaux glycosans et anhydrosucres

Les 1,6 anhydroglucoses: Ils constituent la classe la plus importante des glycosans. Le 1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucopyranose, trivialement appelé lévoglucosan ou  $\beta$ -glucosan, ainsi que son homologue sous forme furanose, ont été les plus étudiés. Ils ont été trouvés en faibles proportions dans les produits de la pyrolyse de l'amidon (Dimler *et al.*, 1946; Bryce *et al.*, 1963; Greenwood, 1967), des dextrines (Pictet *et al.*, 1918a et b; Pictet *et al.*, 1920b), de la cellulose (Golova *et al.*, 1959) et de  $\beta$ -D-glucosides (Kilzer *et al.*, 1965), de dextrans (Metzger *et al.*, 1992), du  $\beta$ -D-glucose (Karrer, 1920) ainsi que lors du traitement du D-glucose dans un milieu contenant de l'acide sulfurique dilué (Peat *et al.*, 1958; Feather *et al.*, 1973). Ils sont le résultat de la dégradation par la chaleur de l'amidon, de la cellulose, du bois et des polysaccharides à glucose.

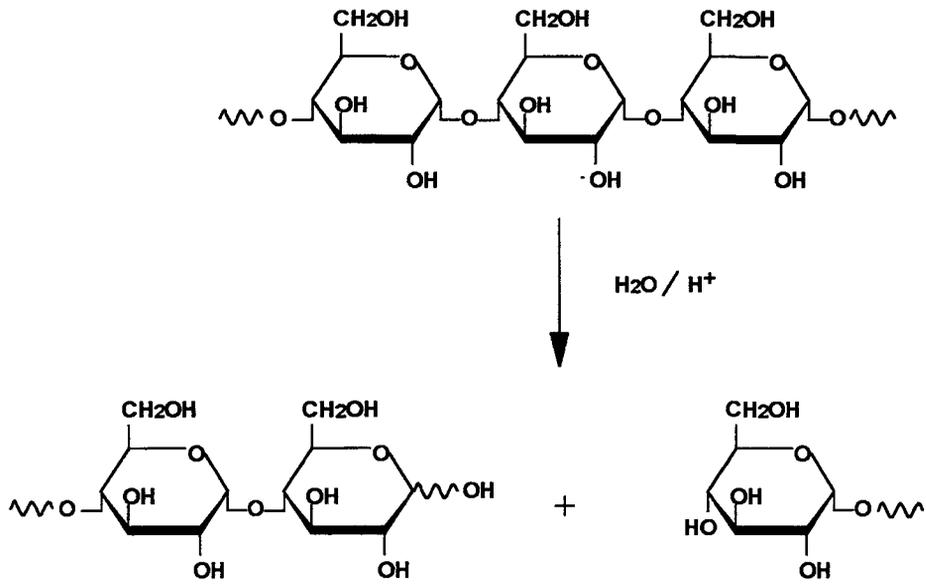
Le mécanisme de la pyrolyse de l'amidon et de la cellulose est extrêmement complexe et les mécanismes de formation de ces glycosans ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, les réactions intervenant au cours de la dextrinification, c'est-à-dire la fabrication des dextrines à partir de l'amidon porté à une température de 150 à 200°C, sont, à l'heure actuelle, mieux connues. La fabrication des dextrines se résume en quatre étapes: l'acidification, le séchage, la cuisson et une étape finale de refroidissement et de réhumidification. Les dextrines sont constituées alors d'un mélange de polysaccharides issus de la dépolymérisation de l'amidon et de sa transformation chimique. Quatre types majeurs de réactions interviennent lors de la dextrinification (Tomasik *et al.*, 1989) (Figure 4):

L'hydrolyse des liaisons  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-6)$ : cette réaction se produit à partir de 50°C en présence d'eau et d'acide en faible quantité, l'hydrolyse des liaisons (1-4) étant préférentielle (Wolff *et al.*, 1952; Thompson *et al.*, 1954; Bryce *et al.*, 1965).

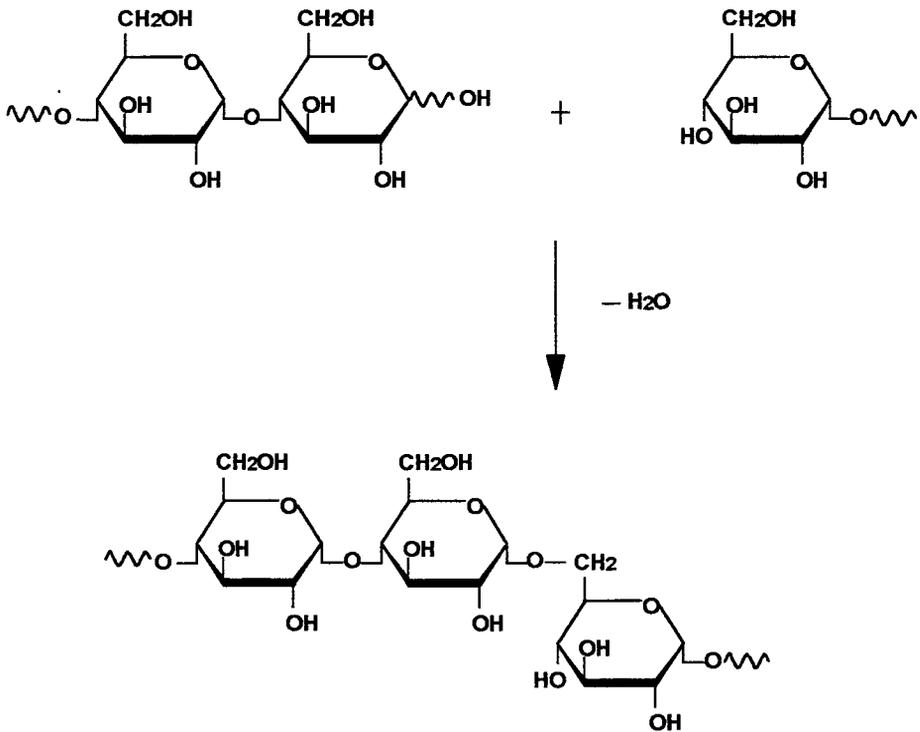
La condensation ou réversion: cette réaction se produit à des températures supérieures à 150°C; elle a lieu préférentiellement en liaisons  $\alpha$  et  $\beta$  (1-6) car ce type de liaison est plus stable que la liaison en (1-4). La réaction libère une molécule d'eau (Wolfrom *et al.*, 1951; Fetzer *et al.*, 1953; Thompson *et al.*, 1958).

La déshydratation ou anhydrisation interne : elle consiste en une perte intramoléculaire d'une molécule d'eau et en la formation d'un acétal préférentiellement entre les carbones 1 et 6, l'anhydroglucose devenant alors terminal (Pictet, 1918; Pringsheim *et al.*, 1922; Irvine *et al.*, 1925; Geerdes *et al.*, 1957; Christensen *et al.*, 1957; Thompson *et al.*, 1958; Carvalho *et al.*, 1959).

La transglycosylation: elle consiste en un échange intermoléculaire par lequel les liaisons en (1-4) dominantes dans la structure native sont remplacées préférentiellement non

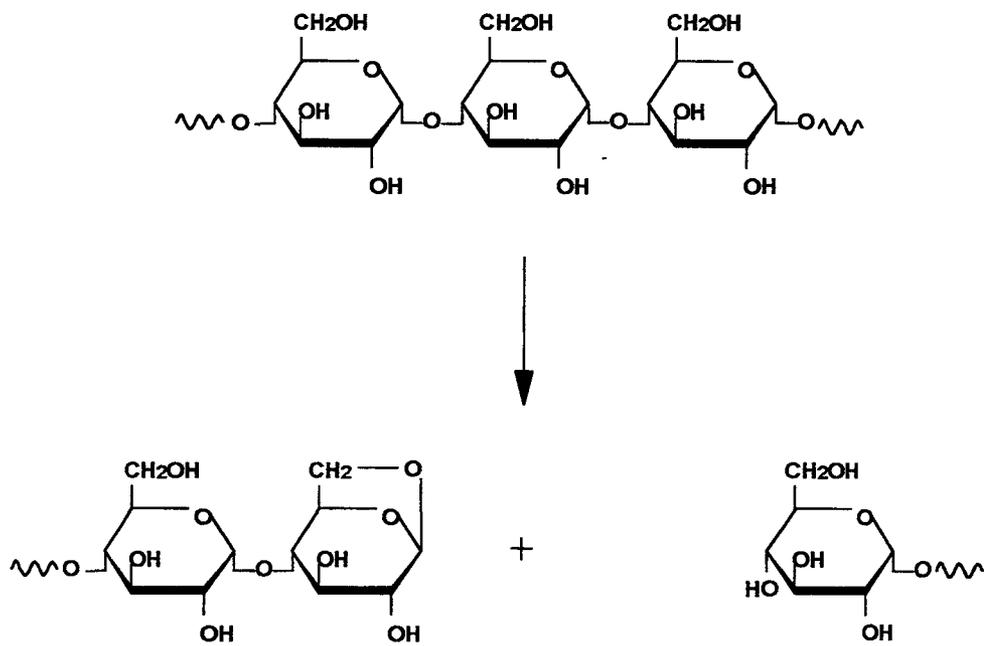


Hydrolyse des liaisons (1- 4)

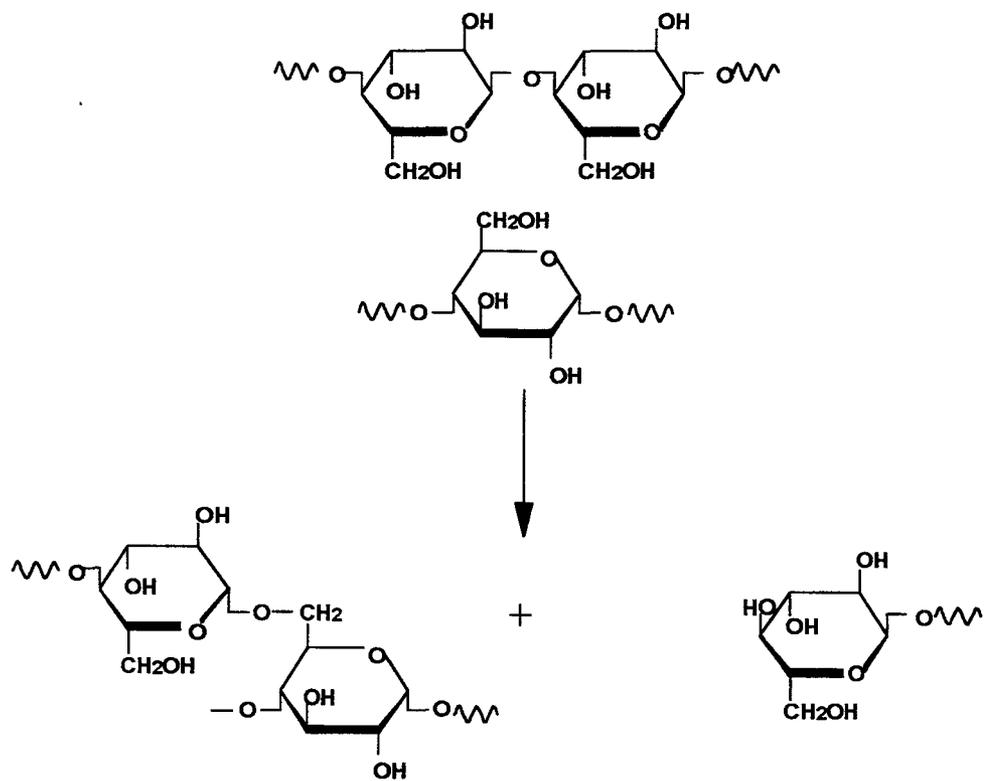


Condensation ou réversion

Figure 4: Réactions mises en jeu au cours de la dextrinification



Déshydratation ou anhydrisation interne



Transglycosylation

Figure 4 (suite): Réactions mises en jeu au cours de la dextrinification

seulement par des liaisons (1-6), mais aussi par des liaisons (1-2) et (1-3). Cette réaction ne consomme pas de molécule d'eau. Elle engendre la formation d'une molécule plus branchée (Kerr *et al.*, 1953; Geerdes *et al.*, 1957; Christensen *et al.*, 1957).

La réaction de transglycosylation est la plus importante lors de la dextrinification. Pour en revenir aux produits que nous avons étudiés, il est intéressant de constater que la présence de lévoglucosan libre a été signalée dans le polydextrose et qu'il a également été décrit lors de la formation des dextrines.

### Les anhydrosucres

Les anhydrosucres sont issus de la synthèse chimique par substitution nucléophile interne de type  $SN_2$  sur des molécules substituées par un groupe partant comme le brome, l'iode, un ester sulfonique, sulfurique ou nitrique. Le mécanisme de formation de ces ponts anhydro est irréversible et n'est possible que dans le cas d'une stéréochimie favorable.

#### 1. 2. 3. Propriétés et applications

##### Les glycosans

Les glycosans sont non réducteurs vis-à-vis d'agents alcalins et ne subissent pas de mutarotation. Ils sont stables en milieu alcalin et instables en milieu acide. L'hydrolyse du glycosan n'est pas accompagnée d'une inversion de Walden, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de changement de configuration, elle régénère le sucre en conservant son anomérie initiale (Freudenberg *et al.*, 1928). Cette anomérie n'est pas stable, surtout en milieu acide, et va donner le mélange des anomères.

Plus particulièrement, le levoglucosan cristallise rapidement et possède une certaine rigidité stérique. En effet, sa conformation est exclusivement en  ${}^1C_4$  (D) alors que l'hexose correspondant est généralement en conformation  ${}^4C_1$  (D), (Figures 5 et 6). Un modèle moléculaire de cette molécule indique que cette structure bicyclique possède une configuration de type  $\beta$ -D (Figure 6). Ces caractéristiques lui confèrent des propriétés physiques et chimiques particulières. Le levoglucosan possède un goût amer-sucré, il n'est pas fermentescible par les levures et reste intact par des traitements par les amylases ou les maltases. Il est soluble à froid dans l'eau, la pyridine, le DMSO et, à chaud, dans les alcools courts, le 1,4-dioxane et l'acétone. Par ailleurs, il est très faiblement soluble dans le chloroforme, l'éther et les autres solvants apolaires. En solution aqueuse acide, il existe un équilibre entre le glucose et son 1,6 anhydride correspondant (Angyal *et al.*, 1968) où le

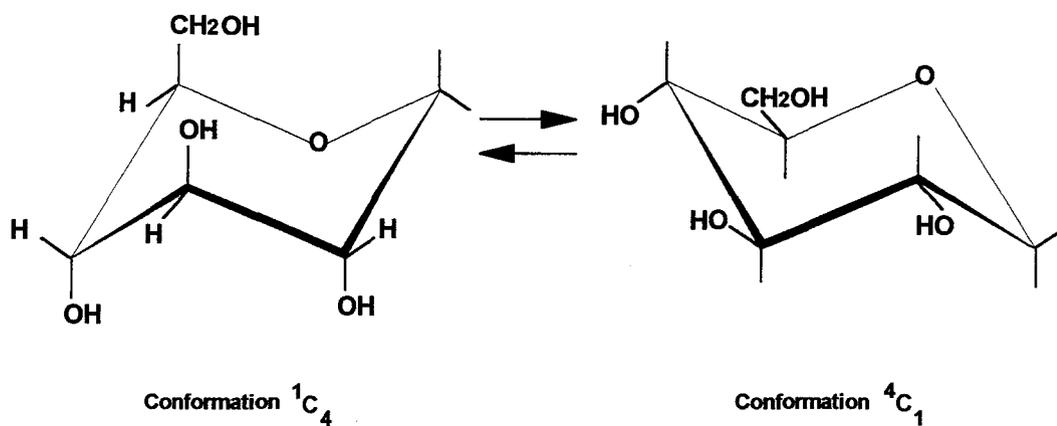


Figure 5: Conformations  ${}^1C_4$  et  ${}^4C_1$  du D-glucopyranose

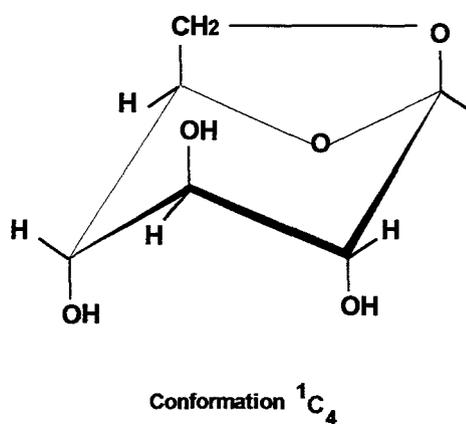


Figure 6: Conformation du 1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucopyranose

glucosan représente environ 2,3% et ne peut se former qu'à partir d'un glucose en conformation  ${}^1C_4$  (D).

Les glycosans sont utilisés pour de nombreuses applications en synthèse d'hexoses, de dérivés d'hexoses et d'oligosaccharides. En effet, la facilité avec laquelle l'acétal interne est hydrolysé par les acides et le fait que le sucre initial soit régénéré font des glycosans des outils de synthèse en chimie. En particulier, le levoglucosan, complètement ou partiellement substitué sous forme d'éthers ou d'esters, permet la synthèse de différents sucres liés en 6. Plus récemment, les glycosans ont été couramment utilisés pour des synthèses stéréosélectives d'oligosaccharides et de fragments de glycoprotéines immunologiquement importants (Lafont *et al.*, 1989 et 1990). La polymérisation des glycosans non substitués, en particulier celle du levoglucosan, a été aussi utilisée pour la synthèse de polysaccharides en présence de catalyseurs (Houminer *et al.*, 1969) ou pour une synthèse thermique (Shafizadeh *et al.*, 1973). La masse moléculaire des polymères obtenus dépend des conditions expérimentales.

### Les anhydrosucres

Le pont anhydro des anhydrosucres ressemble aux éthers aliphatiques de formule R-O-R, composés relativement inertes chimiquement et stables vis-à-vis de nombreux réactifs, acides ou alcalins. Cependant, à cause de l'état de tension du cycle, les époxydes sont susceptibles de réagir avec l'eau pour régénérer un diol.

Les anhydrosucres sont couramment utilisés en synthèse chimique, notamment les 2,5 et 3,6 anhydrosucres (respectivement appelés hydrofuranol et butylène oxydes) et les 2,3 époxydes (éthylène oxyde) (Defaye, 1970).

### 1. 3. Les produits de dégradation des sucres en milieu acide

Dans certaines conditions, les sucres peuvent subir des modifications. Déjà, quand l'acidité ou la basicité est modérée, le carbone anomérique des monosaccharides en solution subit une mutarotation pour finalement aboutir à un équilibre des formes anomères  $\alpha$  et  $\beta$ . Lorsque les conditions acides ou basiques sont plus drastiques, les monosaccharides peuvent alors être modifiés par une réaction d'énolisation puis une réaction de  $\beta$ -élimination. Alors que la formation d'acides sacchariniques et la fragmentation (coupure des liaisons osidiques) sont privilégiées en milieu basique, la formation de furanes et la glycosidation sont favorisées en milieu acide (Pigman *et al.*, 1982). Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux

modifications dues aux conditions acides étant données qu'elles correspondent aux conditions de fabrication des polydextroses.

### 1. 3. 1. La glycosidation

Un aldose ou un cétose peut réagir avec une fonction alcool en présence d'un catalyseur acide. Lorsque cette fonction alcool appartient à un autre monosaccharide, un disaccharide ou des oligosaccharides sont alors formés, cette réaction est appelée réaction de réversion. Cette réaction, observée lors de la dextrinification, a été présentée dans le paragraphe précédent. Par contre, si la fonction alcool appartient au sucre même, il y a formation d'un acétal interne. Nous avons aussi détaillé cette réaction précédemment avec la possibilité d'obtention d'un anhydrosucre ou d'un glycosan.

### 1. 3. 2. La formation de furanes

En milieu acide et à chaud, la plupart des aldoses et cétooses ainsi que leurs dérivés peuvent être dégradés en 2-furaldéhyde. La réactivité des aldoses est inférieure à celle des cétooses. Dans le cas particulier du glucose, il y a formation de 5-hydroxyméthyl 2-furfural ou HMF (van Dam, *et al.*, 1986; Rigal, 1981). Les mécanismes proposés de déshydratation suivie d'une cyclisation sont nombreux et ont fait l'objet de quelques discussions (Anet, 1964; Harris, 1973; Antal *et al.*, 1990). Dans une réaction consécutive, le HMF est réhydraté et subit une coupure carbone-carbone à l'origine de l'acide lévulinique et l'acide formique (Anet, 1964; Harris, 1973) (Figure 7). Ces deux acides se forment en quantité équimolaire. Le mécanisme de dégradation du HMF n'est pas totalement élucidé mais l'importance de la concentration en eau et du pH prouvent qu'il s'agit d'une réaction de réhydratation du HMF catalysée par les acides.

Par ailleurs, Shaw *et al.*, ont montré qu'il existait un nombre important de produits secondaires résultant de la déshydratation des hexoses (Shaw *et al.*, 1967).

### 1. 3. 3. Produits colorés et humines

L'apparition de coloration au cours de la transformation de produits agro-alimentaires a une importance considérable sur le plan industriel. Elle possède deux origines en fonction des groupements en présence. D'une part, la réaction de Maillard produit des pigments bruns lorsque les aldoses se condensent avec des amines pour former des glycosamines. En milieu légèrement acide, le produit principal de la décomposition de ces composés est le HMF. D'autre part, des solutions d'hexoses chauffées en milieu acide développe une coloration

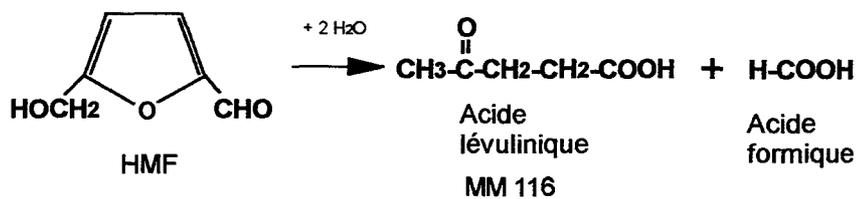
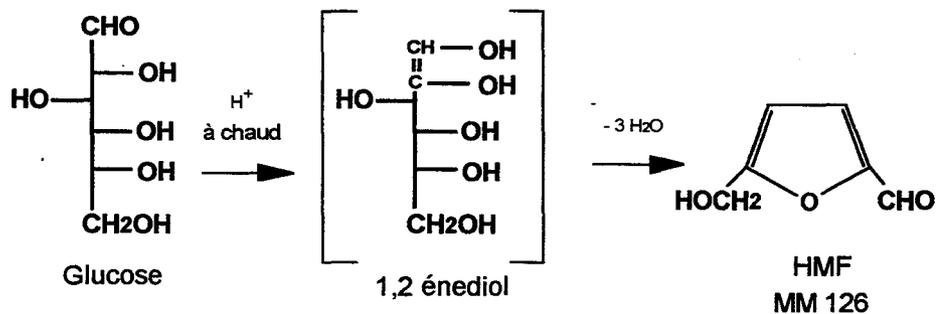


Figure 7: 5-hydroxyméthyl2-furfural (HMF), acide lévulinique et acide formique: produits de dégradation du glucose en milieu acide

jaune suivie par un précipité brun et finalement un produit résineux noir insoluble. La nature de ces produits comme leur mécanisme de formation ne sont pas établis de façon précise. Cependant, de nombreux auteurs s'accordent à attribuer au HMF le rôle de précurseur de polymérisation. Ces produits insolubles sont appelés humines et ils résulteraient de la copolymérisation entre plusieurs produits de dégradation et le HMF (Pour revue: Choudhry, 1981).

Les conditions de formation de ces différents produits étant relativement proches des conditions d'obtention des polydextroses, nous nous attendons à en rencontrer dans les polymères glucidiques de type polydextrose.

#### 1. 4. Les dérivés glucidiques homologues

La caractérisation par spectrométrie de masse des polymères glucidiques de type polydextrose ainsi que leur analyse structurale ont nécessité l'utilisation de nombreux témoins de nature oligosaccharidique tels que des maltodextrines et des oligosaccharides commerciaux.

##### 1. 4. 1. Les maltodextrines

Les maltodextrines commercialisées sous le nom de Glucidex<sup>®</sup> par la société Roquette sont obtenues par hydrolyse ménagée (chimique ou enzymatique) de l'amidon de maïs. Elles sont ensuite purifiées et séchées par atomisation. La poudre obtenue est blanche, neutre de goût ou légèrement sucrée. Leurs propriétés de solubilité dans l'eau, d'agent texturant et anticristallisant et leurs qualités nutritionnelles leur permettent de couvrir une gamme étendue d'applications dans les domaines alimentaires et diététiques.

Le terme de Glucidex<sup>®</sup> est suivi d'un nombre qui représente la valeur du "dextrose équivalent" (DE). Le DE exprime le pouvoir réducteur de la maltodextrine, c'est-à-dire le niveau d'hydrolyse de l'amidon. Le DE est défini comme étant le nombre de grammes de sucres réducteurs exprimés en glucose pour 100 grammes de substance sèche. Il est mesuré par la méthode de Lane et Eynon (Lane *et al.*, 1923). Le DE du glucose est égal par définition à 100, celui des sirops de glucose est compris entre 99 et 20 et celui des maltodextrines est toujours inférieur à 20.

#### 1. 4. 2. Oligosaccharides divers

La  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) est un oligosaccharide cyclique composé de 7 résidus de glucose liés en  $\alpha(1-4)$  et synthétisé par la cyclomaltodextrineglucanotransférase (EC: 2.4.1.19), plus connue sous le nom de CGTase, isolée de *Bacillus circulans* par exemple. Sa structure cyclique délimite une cavité hydrophobe donnant des propriétés d'inclusion à la molécule.

Les oligosaccharides commerciaux que nous avons utilisés sont, d'une part les maltooligosaccharides de DP2 à 7 c'est-à-dire des résidus de D-glucose liés entre eux par des liaisons  $\alpha(1-4)$ , et, d'autre part toute la gamme des disaccharides à glucose. Le nom usuel et la structure de ces disaccharides sont détaillés dans le Tableau 2.

Tableau 2: Nom et structure des disaccharides

Nom	Structure
<b>tréhalose</b>	glc ( $\alpha 1, \alpha 1$ ) glc
<b>kojibiose</b>	glc $\alpha(1-2)$ glc
<b>sophorose</b>	glc $\beta(1-2)$ glc
<b>nigérose</b>	glc $\alpha(1-3)$ glc
<b>laminaribiose</b>	glc $\beta(1-3)$ glc
<b>maltose</b>	glc $\alpha(1-4)$ glc
<b>cellobiose</b>	glc $\beta(1-4)$ glc
<b>isomaltose</b>	glc $\alpha(1-6)$ glc
<b>gentiobiose</b>	glc $\beta(1-6)$ glc

---

## **Chapitre 2**

### **Généralités**

---

## CHAPITRE 2. Méthodes d'investigations

### 2. 1. Caractérisation des polymères glucidiques

La détermination de la composition élémentaire (C, H, O, N) représentative de la composition d'un produit fut, pendant longtemps, la première mesure effectuée afin d'établir sa formule ou d'en vérifier la pureté. Jusqu'à la fin des années 70, les techniques utilisées pour l'analyse des polymères étaient entre autres: l'électrophorèse, la chromatographie liquide et l'ultrafiltration. A cause de la distribution des masses moléculaires d'un polymère par rapport à la masse moléculaire unique d'un corps simple, la mesure expérimentale de la masse moléculaire de polymères ne peut être exprimée qu'en terme de valeur moyenne. Les résultats obtenus étaient alors peu précis car ces techniques utilisant au mieux un étalonnage approximatif tenaient difficilement compte de paramètres tels que la conformation ou l'hydrophobicité des molécules.

De nos jours, alors que d'anciennes techniques (osmométrie, cryométrie) sont toujours utilisées, des techniques nouvelles, en particulier la spectrométrie de masse, ont été mises au point pour couvrir des domaines de masses moléculaires s'étendant de 1.000 à 500.000 Da. Cette technique, devenue très courante, présente les caractéristiques requises pour la détermination précise des masses moléculaires d'un polymère: d'une part, une bonne résolution rend possible la séparation et la détermination de la masse moléculaire de chaque composant et d'autre part, une fragmentation absente ou peu importante des molécules permet de donner une image représentative du produit.

#### 2. 1. 1. Définitions

La masse moléculaire moyenne en nombre ( $\overline{Mn}$ ) et en poids ( $\overline{Mp}$ ) ainsi que le degré de polymérisation moyen ( $\overline{DP}$ ) et l'indice de polydispersité ( $I$ ) sont les grandeurs exprimées dans le but de caractériser la distribution glucidique des polymères (Billmeyer, 1984; Gowariker *et al.* 1986).

Degré de polymérisation moyen ( $\overline{DP}$ )

Le degré de polymérisation moyen est exprimé par:

$$\overline{DP} = \frac{\sum n_i DP_i}{\sum n_i}$$

où  $n_i$  est le nombre de molécules de masse moléculaire  $M_i$  et  $DP_i$  le degré de polymérisation c'est-à-dire le nombre de motifs de répétition dans la molécule.

#### Masse moléculaire moyenne en nombre ( $\overline{Mn}$ )

La masse moléculaire  $M_i$  d'un oligosaccharide est égale à  $DP_i \times m_i$  où  $m_i$  est la masse moléculaire de l'unité de répétition. Cette relation permet de calculer la masse moléculaire moyenne en nombre représentée par:

$$\overline{Mn} = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum c_i}{\sum \frac{c_i}{M_i}}$$

où  $n_i$  et  $c_i$  représentent respectivement le nombre et la concentration pondérale de chaque molécule de masse  $M_i$ , la concentration pondérale  $c_i$  étant égale à  $n_i \times M_i$ . Cette moyenne s'obtient, entre autre, par dosage des groupes terminaux des molécules ou par dosage chimique des sucres réducteurs (osmométrie, cryométrie, RMN).

La somme est effectuée de  $i = 1$  (le monomère) jusqu'à  $i = \infty$  (le DP le plus élevé), où  $i$  représente le degré de polymérisation (DP) c'est-à-dire le nombre de motifs.

#### Masse moléculaire moyenne en poids ( $\overline{Mp}$ )

La masse moléculaire moyenne en poids est exprimée par la relation:

$$\overline{Mp} = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i}$$

Cette valeur est préférentiellement obtenue par des techniques faisant intervenir la taille des molécules comme la diffusion de la lumière ou l'ultracentrifugation.

Il ne faut pas perdre de vue que ces mesures sont réalisées en solution et qu'elles dépendent de la concentration en polymère. Les composantes de masse moléculaire les plus élevées influencent plus fortement le calcul du  $\overline{Mp}$  que celui du  $\overline{Mn}$  et par conséquent la valeur du  $\overline{Mp}$  est toujours supérieure à celle du  $\overline{Mn}$ .

#### Notion de polydispersité ( $I$ )

Les masses  $M_i$  des molécules composant un polymère sont en général très hétérogènes. L'indice de polydispersité, défini par  $I = \frac{\overline{Mp}}{\overline{Mn}}$ , représente la largeur de la distribution des masses moléculaires dont dépendent étroitement les propriétés physico-chimiques et

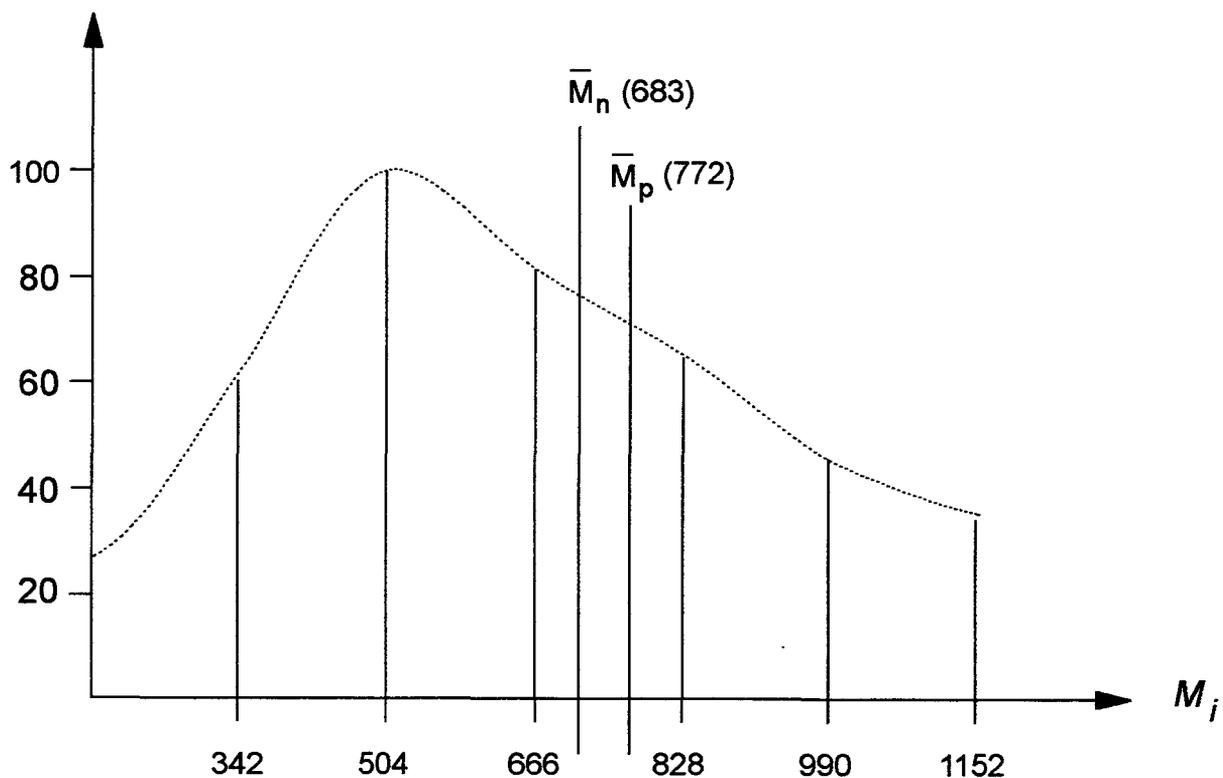
biologiques du polymère. Ce paramètre, souvent cité dans la littérature pour caractériser ce type de mélange moléculaire, peut prendre des valeurs relativement étendues comme le montre le Tableau 3.

Tableau 3: Indices de polydispersité typiques de polymères synthétiques (d'après Billmeyer, 1984).

Polymères	Indice de polydispersité ( $I$ )
Monodispersé hypothétique, $\overline{Mn}$ isomoléculaire	1,00
Monodispersés	1,01 à 1,05
Polymères issus de condensation	environ 2,0
Polymétacrylates ou polyéthylènes	3 à 4
Polymères branchés	20 à 50

Ces grandeurs,  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$ , ainsi que la notion de distribution de masses moléculaires sont illustrées par l'exemple de la Figure 8.

Intensité relative (%)



$DP$	$M_i$	<i>Intensité relative</i>
2	342	60
3	504	100
4	666	82
5	828	65
6	990	45
7	1152	35

$\overline{DP}$	$\overline{Mn}$	$\overline{Mp}$	$I$
4	683	772	1,13

Figure 8: Distribution de masses moléculaires d'un polymère hypothétique constitué de maltooligosaccharides de DP2 à 7 et les valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$  et  $I$  associées.

## 2. 1. 2. Détermination de la masse moléculaire et distribution glucidique

La détermination des masses moléculaires et l'analyse de la distribution glucidique des polymères ont été abordées au cours de notre étude par diverses techniques dont la résonance magnétique nucléaire, la cryométrie, la chromatographie de filtration sur gel et la spectrométrie de masse.

### *Cryométrie*

La cryométrie a été la première technique utilisée pour déterminer des masses moléculaires. Il s'agit d'une méthode dont le principe repose sur l'abaissement du point de congélation d'une solution par rapport à celui du solvant pur. Trois conditions doivent être remplies: la solution doit être diluée, les premiers cristaux doivent être constitués exclusivement par du solvant pur et les molécules de soluté ne doivent subir aucune modification au cours de la dissolution. Cette technique simple est toujours employée mais conduit souvent à des résultats difficilement reproductibles. Aussi, préfère-t-on souvent utiliser la cryométrie différentielle qui consiste à mesurer la différence de température établie entre le point de congélation de la solution à étudier et celui d'une solution de référence. La cryométrie convient surtout à la mesure de la masse moléculaire de molécules relativement petites étant donné que l'abaissement du point de congélation est inversement proportionnel à la masse moléculaire du corps. Lorsque la masse moléculaire augmente, l'écart de température entre le point de congélation de la solution référence et celui du soluté diminue jusqu'à ne plus être mesurable.

### *Résonance magnétique nucléaire*

Le spectre RMN 1D du proton d'un polymère apporte des informations structurales qui seront détaillées dans le paragraphe 3.1. Des informations quantitatives peuvent être aussi obtenues par intégration des signaux du spectre RMN étant donné que la surface des pics est proportionnelle au nombre de protons responsables des signaux (McIntyre *et al.*, 1990).

D'autre part, le spectre du proton permet aussi d'évaluer le taux de sucres réducteurs d'un polymère glucidique puis, par calcul, d'estimer le degré de polymérisation moyen ( $\overline{DP}$ ) pour des valeurs comprises entre 1 et environ 15. Il suffit pour cela d'émettre l'hypothèse que le polymère glucidique est en fait un oligosaccharide unique de taille égale à la composante la plus représentative du polymère c'est-à-dire le  $\overline{DP}$ . La surface des pics de tous les protons

anomériques des composantes du polymère est assimilée à la surface des pics des protons anomériques de l'oligosaccharide réducteur qui est, par définition, égale à 1. Les déplacements chimiques  $\delta$  des protons  $H_1$  terminaux réducteurs  $\alpha$  et  $\beta$  du glucose sont respectivement égaux à 5,30 et 4,73 ppm. La somme des surfaces des pics correspondant aux autres protons est alors calculée par simple règle de trois afin de déterminer ce qui correspond au  $\overline{DP}$  du polymère.

Les limites de cette technique sont relativement nombreuses et parmi celles-ci, le seuil de détection des protons  $H_1$  anomériques. En effet, au delà de 15 résidus monosaccharidiques, les surfaces de pics correspondant aux protons anomériques sont faibles par rapport à celles des autres protons et l'intégration des surfaces délicate. D'autre part, la nature des composantes du polymère est importante, l'estimation du  $\overline{DP}$  n'est possible que dans le cas de composés totalement réducteurs ou réduits. Des estimations ont donc été réalisées sur des maltodextrines mais cette technique n'est pas applicable aux polydextroses étant donné la coexistence de molécules réductrices et non réductrices. Cette approche est d'autant plus délicate que l'hétérogénéité des liaisons glucidiques du polymère est plus importante. Par ailleurs, le chevauchement des pics dû à un spectre non totalement résolu et la difficulté d'attribution des signaux rendent impossible toute intégration.

### *Chromatographie de filtration sur gel*

Les méthodes chromatographiques sont les méthodes les plus couramment utilisées pour l'analyse de la composition et de la distribution des polymères. Parmi celles-ci, la filtration sur gel est une méthode de choix pour caractériser des échantillons polydispersés. Elle est généralement utilisée pour le fractionnement de molécules en fonction de leur masse moléculaire. En 1982, Yamashita *et al.*, décrivent des données concernant la taille d'oligosaccharides exprimés en nombre d'unité glucose grâce à une colonne de Biogel P4 (Biorad), par comparaison du volume d'élution avec celui de molécules standards (dextrans). Cette méthode relativement longue a été améliorée par son application en chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Elle permet ainsi d'allier rapidité, reproductibilité et estimation de la masse moléculaire d'une molécule présente en faible quantité. La masse moléculaire est estimée en utilisant la relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire  $\log M = f(V_e)$ . Cette relation dépend des conditions chromatographiques définies (dimensions de la colonne, nature de l'éluant, débit de l'élution, température) et n'est valable que pour des molécules de structure analogue. Il est, par

conséquent, indispensable d'étalonner la colonne avec des substances de structure aussi proche que possible des molécules à étudier (Kobata *et al.*, 1987).

Cependant cette méthode a des limites. Tout d'abord, l'étalonnage par des témoins donne une masse relative exprimée en " unité témoin " au lieu d'une masse absolue. D'autre part, les polymères doivent être correctement dissous dans le solvant et le facteur de concentration à l'injection est primordial car les enchevêtrements moléculaires conduiraient à des distributions anormalement éclatées. Enfin, il est difficile de quantifier les faibles et les hautes masses moléculaires. Pour les basses masses, la hauteur du signal n'est plus proportionnelle à la concentration d'éluion. Les hautes masses peuvent être retenues par le gel ou subir des effets de cisaillement, ce qui augmente les sources d'erreurs pour les polymères polydispersés (Dubois, 1988).

### *Spectrométrie de masse*

L'un des avantages primordial des techniques de spectrométrie de masse par rapport aux méthodes plus conventionnelles détaillées précédemment est un pouvoir de résolution suffisant pour permettre la mesure de la masse moléculaire et de l'abondance relative de chaque oligomère constitutif d'un polymère donné (Guittard *et al.*, 1996). Pourtant, les polymères forment une des classes de produits les plus difficiles à analyser par spectrométrie de masse. En effet, ils sont constitués par un mélange hétérogène de par leur gamme étendue de masses moléculaires, et certains d'entre eux ne sont pas totalement solubles dans les matrices ou les solvants utilisés dans les techniques telles que la FAB, l'électrospray ou le MALD.

Quant à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation EI et CI couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS), utilisée depuis de nombreuses années pour l'analyse structurale des glycanes (détermination de la composition en monosaccharides et des liaisons glycosidiques), elle ne s'applique qu'à des monosaccharides résultant d'une hydrolyse ou d'une méthanolyse et rendus volatils par dérivation ou à des di- et trisaccharides. Les applications aux molécules polaires de grande taille, non volatiles et thermolabiles telles que les polymères glucidiques sont donc très limitées.

Dans les années 80, le développement de techniques d'ionisation par désorption telles que la *fast atom bombardment* (FAB) puis la désorption ionisation laser assistée par une matrice (MALD) et l'électrospray (ES) a permis de nombreuses applications dans l'analyse des biomolécules. Ces techniques permettent l'analyse directe de molécules polaires,

thermolabiles et/ou de hautes masses moléculaires. Les spectres de masses obtenus avec ces techniques sont généralement caractérisés par des signaux intenses correspondant aux espèces moléculaires de type  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  ou  $[M-H]^-$ . Ces spectres sont aussi caractérisés par l'absence ou la faible intensité des fragments, ce qui permet dans le cas d'échantillons dispersés comme les polymères d'établir directement le profil de la distribution.

Chacune de ces trois techniques requiert un analyseur spécifique: un secteur magnétique (FAB), un analyseur à temps de vol (MALD) ou un quadripôle (ES). Les performances comme la gamme de masse, la résolution, la sensibilité et l'exactitude des mesures dépendent de la configuration de l'instrument. Pour les polymères glucidiques, le problème réside au niveau de la détection des ions monochargés et de masse moléculaire élevée difficilement détectables avec une bonne sensibilité et une bonne résolution.

L'approche par spectrométrie en mode FAB des polymères glucidiques reste toutefois limitée en raison d'une discrimination importante des composés en fonction de leur caractère hydrophile.

Les techniques d'ionisation douce, MALD et ES, développées durant ces dix dernières années, sont les plus prometteuses de toutes les techniques analytiques pour la détermination précise de polymères de masses moléculaires supérieures à 2000 Da. Ces renseignements ne peuvent être retenus pour une analyse quantitative, si et seulement si, la désorption des ions de l'échantillon, leur transfert à l'analyseur et leur détection se font sans aucune discrimination de masse, ce qui est rarement le cas.

A titre d'exemple, Garrozzo *et al.* (1995) effectue des analyses de polymères glucidiques natifs et méthylés de type dextran de masse moléculaire allant jusqu'à 100 000 Da par MALD/MS (Figure 9). L'auteur conclut à un développement certain de cette technique pour des polymères de plus hautes masses moléculaires. D'autre part, Tinke *et al.*, (1993) caractérise des polysaccharides neutres et acides par ES/MS en mode positif et négatif. En mode positif, la détermination de la masse moléculaire d'une maltodextrine peut atteindre 4000 Da soit un DP 25. Le spectre présente des ions monochargés  $[M+Na]^+$  et dichargés  $[M+2Na]^+$  (Figure 10).

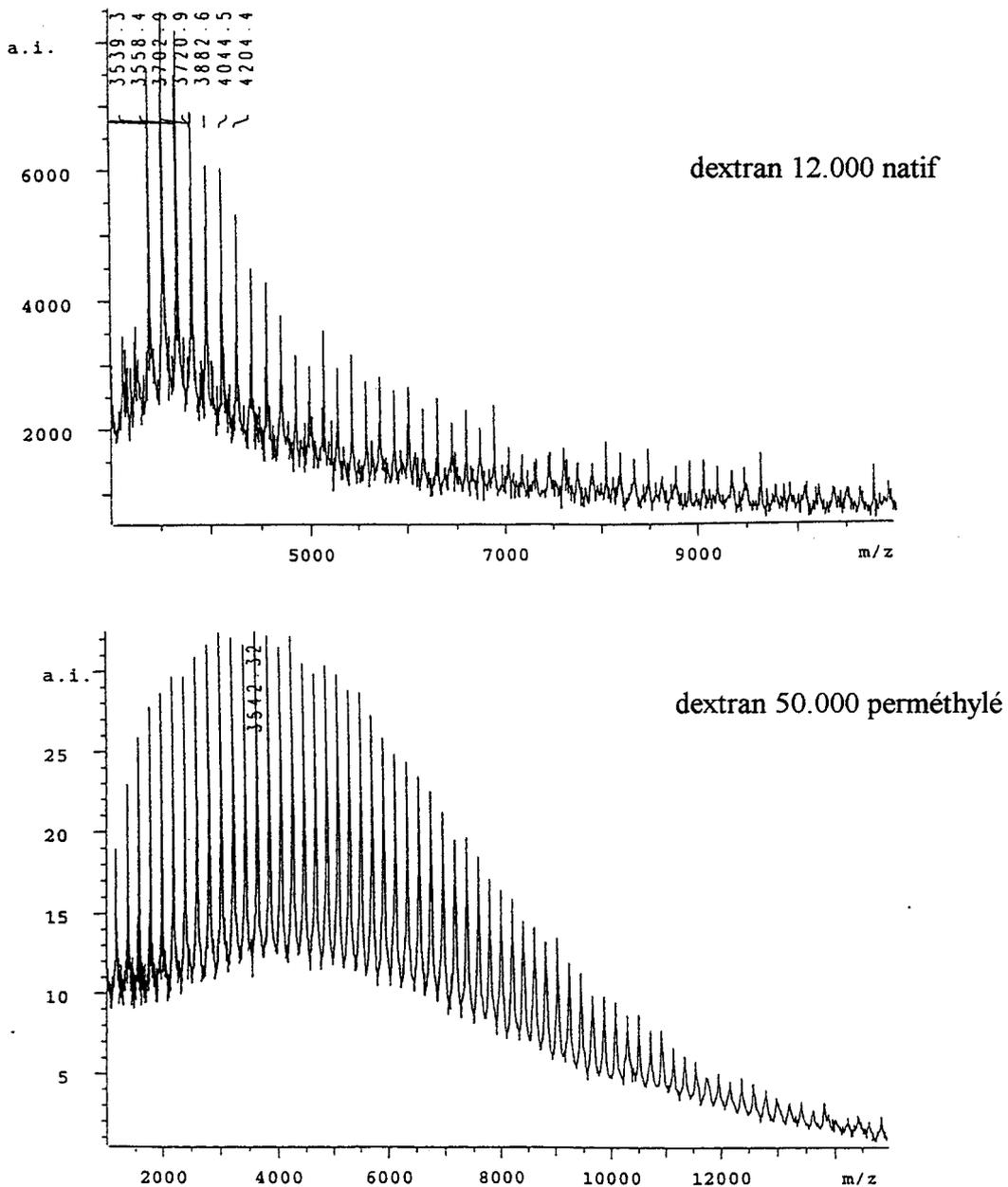


Figure 9: Spectres MALD/MS de dextrans natif et perméthylé (D'après Garrozzo, 1995)

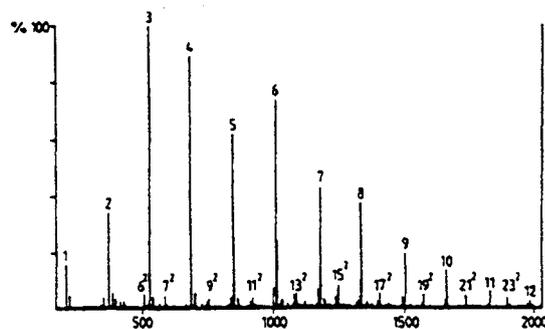


Figure 10: Spectres ES/MS en mode positif d'une maltodextrine native (D'après Tinke, 1993)

Spectre obtenu par infusion à  $1\mu\text{l}/\text{min}$  dans une solution  $3 \cdot 10^{-4}\text{M}$  acétate de sodium dans un mélange méthanol/eau (40/60, v/v) pendant 5 min.

Le degré de polymérisation (DP) est noté sur les pics et  $\text{DP}^2$  indique les ions doublement chargés.

## 2. 2. Analyse structurale des polymères glucidiques par spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de mesurer avec précision les masses moléculaires ainsi que d'obtenir des informations structurales sur les substances étudiées. Il comprend cinq éléments: un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ionisation, un analyseur spécifique pour séparer les ions produits, un détecteur d'ions qui attribue l'intensité du faisceau ionique correspondant à chaque espèce et un système informatique permettant l'acquisition du spectre de masse et le traitement des données.

Certains spectromètres de masse possèdent plusieurs analyseurs en série, séparés par une ou plusieurs cellules de collision; il s'agit du cas particulier de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

### 2. 2. 1. Techniques de désorption

#### Ionisation par *fast atom bombardment* (FAB)

En 1981, Barber *et al.* décrit une nouvelle technique de désorption et d'ionisation où l'innovation réside dans l'utilisation d'une matrice liquide bombardée par des atomes neutres accélérés, la *fast atom bombardment* (FAB). Il est dorénavant possible de générer à partir de substances polaires et de masses moléculaires élevées des espèces moléculaires de forte intensité. Cette technique fut largement utilisée pour l'analyse d'échantillons peptidiques, glucidiques et nucléotidiques (Barber *et al.*, 1984; Rinehart, 1982; Egge *et al.*, 1987). Les informations recueillies sont, d'une part la détermination de la masse moléculaire, et d'autre part l'acquisition de spectres de collision par spectrométrie de masse en tandem en vue d'une étude structurale. Dans le cas de la FAB-MS/MS, une espèce moléculaire ou un fragment sélectionné dans le premier analyseur génère des ions fragments dans la cellule de collision qui sont analysés dans le second analyseur. Cette technique s'est notamment montrée très efficace pour l'analyse de glycanes libres ou conjugués (Carr *et al.*, 1985; Gillice-Castro et Burlingame, 1990a)

#### *Principe*

L'échantillon est solubilisé dans une matrice liquide, telle que le glycérol ou le thioglycérol c'est-à-dire des molécules peu volatiles, sur un porte-échantillon d'une canne d'introduction

directe. Il est ensuite bombardé par un faisceau d'atomes de gaz neutre (argon ou xénon) de forte énergie cinétique ou d'ions césium, ce qui a pour conséquence de désorber les molécules à analyser de la matrice et de les ioniser (Figure 11). Les ions formés sont focalisés vers l'analyseur constitué le plus souvent par des secteurs magnétiques et électrostatiques.

Lors du bombardement, des ions positifs et négatifs ainsi que des fragments neutres sont expulsés. On peut donc choisir de détecter les ions, selon le but recherché, en mode positif ou négatif. Les mécanismes de désorption et d'ionisation sont encore mal connus. Les collisions en cascades résultant de l'impact des atomes ou des ions utilisés lors du bombardement provoqueraient l'ionisation dans la matrice et induiraient une transition localisée de la phase liquide vers une phase gazeuse par augmentation de température. Les ions en surface de la matrice se trouveraient proches d'un état gazeux. Les réactions ions-molécules sont celles observées généralement en phase gazeuse, elles correspondent à des transferts de protons et la formation d'adduits avec des métaux alcalins.

L'ion monochargé  $[M+H]^+$  correspondant à la molécule protonnée est détecté en mode positif, alors que l'espèce déprotonnée donne un ion  $[M-H]^-$  détecté en mode négatif. Ces ions sont en général les plus intenses. On observe des ions de cationisation tels que  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  et parfois la formation d'ions doublement chargés  $[M+2H]^{2+}$  ou  $[M-2H]^{2-}$ , des ions fragments, des ions d'addition avec la matrice  $[M+matrice+H]^+$  ou  $[M+matrice-H]^-$ . Les ions de cationisation en faible quantité permettent de confirmer la masse de l'espèce moléculaire.

La revue de Fenselau et Cotter (1987) résume l'ensemble des phénomènes chimiques dont la formation des ions ainsi que le rôle de la matrice lors de l'ionisation FAB.

La présence de sels en grande quantité dans le milieu inhibe la réponse lors de l'analyse, allant même jusqu'à la disparition complète du signal et ne donnant que des adduits de matrice additionnés de sels.

### *Phénomène de suppression*

Lors de l'analyse en FAB, l'intensité de la réponse est dépendante de la nature hydrophobe de la substance à analyser. Ceci est particulièrement bien décrit pour les peptides (Caprioli *et al.*, 1987; Naylor *et al.*, 1986; Naylor *et al.*, 1988). Ces derniers auteurs décrivent le phénomène selon lequel un peptide à caractère hydrophobe possède une activité de surface plus importante qu'un peptide hydrophile. Par conséquent, il aura une plus grande probabilité de se trouver en surface de la matrice et d'être expulsé lors du bombardement. Ce phénomène

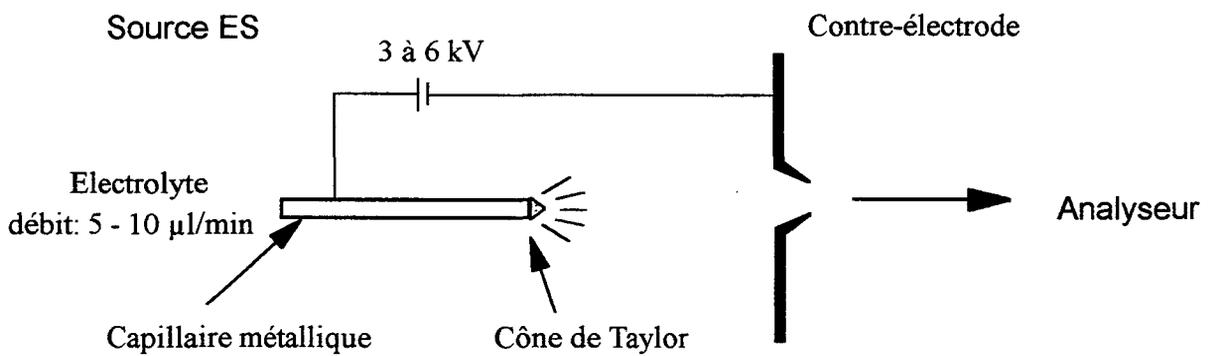
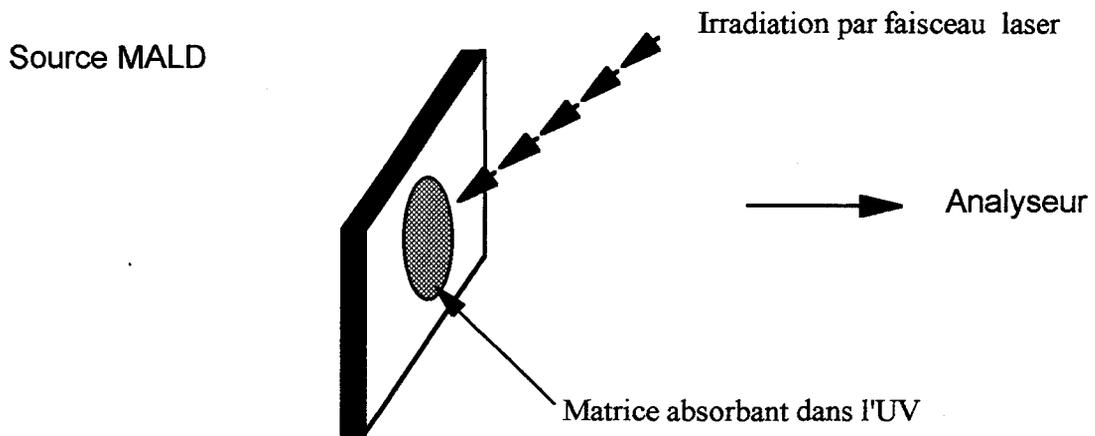
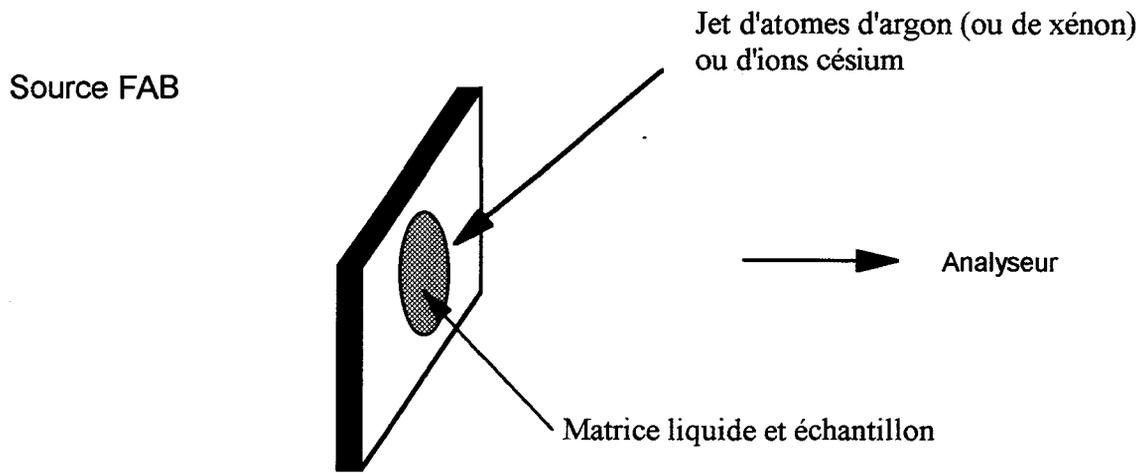


Figure 11: Schémas des principes des techniques de désorption

de suppression est un des handicaps de la technique FAB. Aussi les auteurs ont utilisé les indices de Bull et Breese en prévision de la réponse. En effet, en 1974, Bull et Breese ont calculé pour chaque acide aminé un indice correspondant à son caractère hydrophile ou hydrophobe. Un indice positif indique un caractère hydrophile et un indice négatif un caractère hydrophobe. L'indice attribué au peptide correspond à la moyenne de tous les indices des acides aminés constituant le peptide et permet une meilleure prévision de la réponse. Un phénomène analogue de diminution de l'intensité du signal de glycopeptides a été décrit en 1988 par Naylor lorsque les peptides possèdent un nombre de résidus glucidiques croissant.

Les oligosaccharides natifs ont tendance à donner des ions de faible intensité correspondant à l'espèce moléculaire. Afin d'augmenter l'activité de surface des molécules, il est possible de les dériver en leur fixant des groupements hydrophobes. L'estérification par acétylation, l'étherification par méthylation ou encore la dérivation par amination réductive augmente l'hydrophobicité des oligosaccharides permettant ainsi d'augmenter le signal de ces ions.

#### *Applications et limites de la technique FAB*

De nos jours, la spectrométrie de masse en mode FAB est utilisée pour la détection de masses moléculaires inférieures à 5000 Da avec une sensibilité de l'ordre de la nanomole et une précision comprise entre 1 et 100 ppm. Pourtant cette technique présente quelques inconvénients notamment pour la caractérisation des polymères glucidiques du fait de la présence du phénomène de suppression, de la faible tolérance aux sels, de la faible réponse des molécules hydrophiles et de la difficulté à analyser des molécules de masse moléculaire inférieure à 300 Da à cause du bruit de fond important de la matrice.

#### Ionisation laser assistée par une matrice (MALD)

En 1988, Karas et Hillenkamp ont découvert une technique de désorption par laser émettant dans l'ultraviolet et faisant intervenir une matrice, la *Matrix Assisted Laser Desorption* (MALD).

### Principe

La technique de désorption par laser assistée par matrice (Hillenkamp, 1990) consiste dans un premier temps à mélanger la substance à analyser à une solution de petites molécules organiques appelée matrice. L'irradiation pulsée produite par le laser (faisceau de lumière monochromatique de haute intensité) sur le mélange échantillon/matrice lui transmet une quantité importante d'énergie par excitation électronique des molécules de la matrice. Il résultera une désorption des ions formés par transfert de protons de la matrice vers l'échantillon (Figure 11).

Les matrices sont des solutions de molécules acides pouvant absorber dans l'U.V. La première matrice décrite pour une analyse d'oligosaccharides fut l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque (Moch *et al.*, 1991). De nos jours, l'acide sinapinique, l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydrocinnamique mais surtout l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (Stahl *et al.*, 1991; Harvey *et al.*, 1996) sont les matrices les plus utilisées. Le rôle de la matrice est double: elle absorbe l'énergie du laser et individualise les molécules de l'échantillon. Le rapport matrice / échantillon est de l'ordre de 100/1 voire 5000/1.

L'énergie du rayonnement est absorbée par la matrice, elle est ensuite restituée en partie et transmise aux molécules de l'échantillon qui seront volatilisées sous forme gazeuse et ionisées. Cette ionisation conduit à la formation d'espèces moléculaires positives et négatives, mono ou dichargées, du type:  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M-H]^-$ ,  $[M-2H]^{2-}$  ou des cations du type  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$ . Le caractère hydrophobe ou hydrophile des échantillons ne semble pas influencer de façon notable le processus de désorption (Karas, 1990).

La nature pulsée du faisceau laser et la courte durée du signal incite à utiliser comme analyseur le temps de vol (*time of flight*, TOF). Les ions produits par l'irradiation du laser sont accélérés sous une différence de potentiel  $V_s$  à plusieurs kV (de 2 à 30 kV) sur une courte distance puis pénètrent dans la zone libre de champ du tube de vol sur une distance  $d$  pour arriver au détecteur. L'énergie cinétique ( $E_c$ ) est la même pour tous les ions mais leur vitesse ( $v$ ) est différente étant donné qu'elle dépend de leur masse ( $m$ ) et de leur état de charge ( $q$ ) avec  $q = ze$  où  $z$  représente le nombre de charges et  $e$  la charge d'un électron.

Un ion possède l'énergie cinétique  $E_c = qVs = mv^2/2$ . Il parcourt la distance  $d$  en un temps  $t$  tel que  $t = d/v$ . Nous obtenons  $t^2 = (m/q) \cdot (d^2/2Vs)$ , en remplaçant  $v$  selon l'équation précédente. Le rapport  $(d^2/2Vs)$  étant constant, la mesure de  $t^2$  permet de connaître  $m/q$ . Le temps de vol des ions est d'autant plus long que sa masse est élevée.

Les analyseurs à temps de vol ont été perfectionnés par l'introduction d'un miroir électrostatique encore appelé réflectron. Il corrige la faible dispersion de l'énergie cinétique des ions lors de l'ionisation. Les ions, d'une masse donnée, initialement les plus rapides c'est-à-dire possédant une plus grande énergie cinétique pénètrent alors plus profondément dans le réflectron et ils auront un trajet plus long que les ions de plus faible énergie cinétique. L'augmentation de vitesse est donc compensée par une augmentation du trajet afin que tous les ions possédant le même  $m/z$  arrivent en même temps au détecteur.

Lors d'analyses de PSD (*Post Source Decay*), le réflectron permet aussi de refocaliser les ions métastables formés dans le tube de temps de vol. Ces ions possèdent la même vitesse mais une énergie cinétique différente de celle de l'ion parent.

### *Caractéristiques du MALD*

La spectrométrie de masse en mode MALD est adaptée à l'analyse de masses moléculaires élevées car le processus de désorption est indépendant de la taille et des propriétés d'absorption de la molécule à analyser. Par contre le bruit de fond dû à la matrice empêche l'analyse des basses masses moléculaires. Sur certains appareils, la cible est visualisée sur un écran grâce à une caméra. Il est alors facile de se focaliser sur une zone précise de co-cristaux matrice/échantillon afin de favoriser le phénomène de désorption.

Les atouts majeurs de cette technique sont, d'une part sa sensibilité de l'ordre de la picomole et, d'autre part, sa tolérance vis-à-vis de sels et de tampons en concentrations couramment utilisées en biochimie. Ces caractéristiques permettent d'appréhender des domaines divers d'applications comme les protéines, les oligosaccharides, les nucléotides et les molécules complexes que sont les glycoprotéines.

### Ionisation par électrospray (ES)

Yamashita et Fenn décrivent pour la première fois l'électrospray en 1984 mais ce n'est qu'en 1988 que cette même équipe applique cette technique aux protéines (Yamashita et Fenn, 1988a et 1988b; Fenn *et al.*, 1990). L'électrospray permet dorénavant l'analyse de protéines dépassant 150 000 Da (Edmonds et Smith, 1990).

## Principe

L'électrospray est une technique d'ionisation et de nébulisation de molécules à partir d'une phase liquide. A pression atmosphérique, un champ électrique puissant est appliqué sur un tube capillaire dans lequel s'écoule l'échantillon en solution à faible débit (1 à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) pour sortir dans une chambre de nébulisation (Figure 11).

Il existe deux types d'introduction de l'échantillon dans la source. Comme le spray est produit par application d'un champ électrique sur un liquide s'écoulant dans le tube capillaire, cette technique semble être la technique de spectrométrie de masse la plus adaptée à un couplage liquide. Le couplage chromatographie liquide/électrospray permet d'allier séparation et analyse par spectrométrie de masse de mélanges complexes. La seconde possibilité est l'introduction directe par infusion. Dans les deux cas, la nature du solvant, le débit de la phase liquide et les différents potentiels appliqués dans la source sont les paramètres qui influencent la taille et l'état de charge des microgouttelettes constituant le spray.

Le champ électrique élevé provoque une accumulation des charges à la surface du liquide à l'extrémité du capillaire et donne naissance à des gouttes fortement chargées. Le processus d'électrospray est indirectement responsable de l'ionisation des molécules car les ions préformés sont déjà présents en solution (Pfeifer *et al.*, 1968; Hayati *et al.*, 1987). L'évaporation du solvant va réduire la taille des gouttes jusqu'à provoquer leur fission générant alors des microgouttelettes. Les ions produits sont porteurs d'une ou de plusieurs charges en fonctions du nombre de sites ionisables sur la molécule. Avant leur entrée dans l'analyseur, la collision avec un flux d'azote va permettre de désolvater les agrégats et permettre la formation d'ions moléculaires multichargés. Le mode d'ionisation par électrospray se caractérise en effet par la multiplicité des états de charge lorsque la molécule possède plusieurs sites ionisables. Dans le cas de molécules n'ayant pas de sites, les ions formés correspondent à des adduits sodiques, potassiques, ammoniums ou autres. Ces ions sont attirés vers l'entrée de l'analyseur par un champ électrique.

L'analyse des oligosaccharides par ES peut être réalisée en mode positif ou négatif en fonction de la nature des oligosaccharides et surtout de leur état de charge. La déprotonation des fonctions acide ou alcool à pH basique des oligosaccharides natifs permet l'acquisition des spectres en mode négatif. Par contre, la protonation en milieu acide des amines ou la cationisation, par  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  de molécules ne possédant pas de sites ionisables comme par exemple les oligosaccharides perméthylés, permet d'obtenir des

spectres de masse en mode positif. Les états de charge des ions détectés dépendent du cation utilisé. En effet, en présence de chlorure de lithium (LiCl), des cyclodextrines partiellement méthylées apparaissent sans phénomène de fragmentation sous la forme d'espèce moléculaire  $[M+Li]^+$  ce qui facilite l'attribution des pics et la détermination de leur masse moléculaire. D'autre part, l'adjonction d'acétate de zinc favorise la formation d'ions doublement chargés  $[M+Zn]^{2+}$  favorisant de ce fait la détermination de la masse moléculaire de molécules dépassant alors la limite de masse de l'analyseur (Metzger *et al.*, 1991).

Les spectres sont parfois difficiles à interpréter à cause de la présence d'états de charges multiples. Ils correspondent à une distribution statistique de pics caractérisant les espèces moléculaires multiplément chargées. Cette complexité est pourtant un avantage car l'obtention de molécules plurichargées permet d'améliorer la sensibilité et d'atteindre des masses moléculaires très élevées à l'aide d'un analyseur pourtant de faible valeur de limite de masse comme le quadrapôle. En effet, l'analyseur ne mesure pas la masse moléculaire mais le rapport  $m/z$ . A partir d'un pic unique, la détermination de la masse moléculaire ne peut se faire que si l'on connaît l'état de charge de l'ion. Selon le modèle hypothétique de la Figure 12 montrant la dispersion des états de charge d'une molécule, en posant l'hypothèse que la charge vient d'une protonation, on peut poser les équations suivantes:  $m_1 = \frac{M + n_1 m_p}{n_1}$  et

$$m_2 = \frac{M + n_2 m_p}{n_2} \quad \text{avec } n_2 = n_1 + 1 \text{ pour deux pics consécutifs, où } m_1 \text{ est la masse du pic 1,}$$

$m_2$  la masse du pic 2 tous deux lus sur le spectre,  $M$  la masse moléculaire que l'on cherche à déterminer,  $n_1$  et  $n_2$  les états de charge respectifs du pic 1 et 2 et  $m_p$  la masse moléculaire du proton.

$$\text{On en déduit que } n_1 = \frac{m_2 - m_p}{m_2 - m_1} \text{ et } M = n_1 (m_1 - m_p).$$

L'augmentation du potentiel dans la source permet de transférer une énergie suffisante aux ions pour les fragmenter et permettre, par exemple, une étude structurale de disaccharides commerciaux notamment dans le but de déterminer la nature de la liaison glycosidique (Garrozzo *et al.*, 1991) ainsi que son anomérie de liaison (Mulrone *et al.*, 1995).

L'électrospray est perturbé par la présence de sels d'où la nécessité d'analyser des molécules dessalées ou d'utiliser un couplage chromatographique liquide pour des oligosaccharides dérivés.

Intensité relative (%)

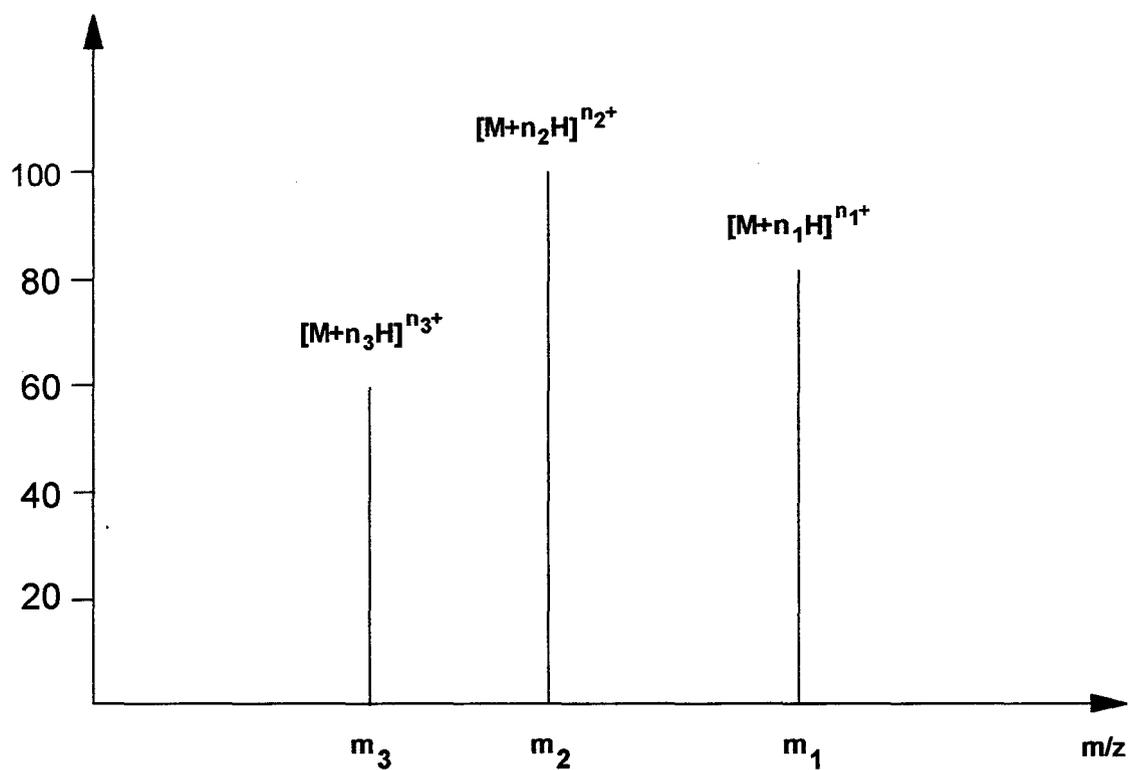


Figure 12: Spectre modèle montrant la dispersion des états de charge d'une molécule protonnée par ESMS.

M masse moléculaire que l'on cherche à déterminer.

En conclusion, les nouvelles techniques d'ionisation douce que sont la FAB, MALD et ES permettent l'analyse directe de composés polaires et/ou thermolabiles. Elles produisent des ions stables ne possédant qu'un faible excès d'énergie ce qui se traduit sur les spectres par des signaux intenses correspondant aux espèces moléculaires. Les informations se limitent donc à la masse moléculaire des composés. Les fragments sont le plus souvent absents ou de faible intensité ce qui permet dans le cas d'échantillons pluri-moléculaires d'obtenir un profil de la distribution des différents composants.

Il a été toutefois démontré que la caractérisation par spectrométrie de masse des polymères glucidiques est plus difficilement applicable par FAB en raison d'une discrimination importante des composants dû au caractère hydrophile des molécules appelée phénomène de suppression.

Les techniques de spectrométrie de masse en tandem, FABMS/MS, PSD/MALD/MS et ESMS/MS génèrent des fragments par collision et apportent des informations structurales complémentaires.

Le Tableau 4, ci-dessous, regroupe les caractéristiques des différents spectromètres de masse en mode FAB, MALD et ES utilisés pour l'analyse des oligosaccharides.

Tableau 4: Caractéristiques des spectromètres de masse en mode FAB, MALD et ES  
(D'après Domon, Imabio, 1994)

	FAB	MALD	ES
<b>Type d'analyseur</b>	magnétique et électrique	temps de vol	quadrupôle
<b>Gamme de masse</b>	≤10.000	<500.000	<150.000
<b>Résolution</b>	2.000 à 10.000	2.500	1.500
<b>Précision</b>	1 à 100 ppm	100 à 300 ppm	50 à 100 ppm
<b>Sensibilité</b>	0,1 à 1 nmol	10 à 100 fmol	0,1 à 1 pmol
<b>Possibilité de MS/MS</b>	oui	oui	oui
<b>Gamme de masse en MS/MS</b>	2.500	6.000	4.000 <sup>(1)</sup>
<b>Type de fragmentation</b>	haute énergie	métastable <sup>(2)</sup>	faible énergie
<b>Possibilité de couplage LC/MS</b>	(oui)	non	oui

(1) ions multichargés, (2) collisions possibles lors de l'accélération

## 2. 2. 2. Application à l'analyse des polymères glucidiques

La spectrométrie de masse détermine tout d'abord la masse moléculaire d'un glycanne ou d'un oligosaccharide permettant ainsi d'en déduire la composition en monosaccharides (par exemple, hexose<sub>x</sub>, N-acétyl hexosamines<sub>y</sub>, acide sialique<sub>z</sub>) et la présence de substituants (par exemple, groupement méthyle, acétyle, sulfate ou phosphate). Cette technique est par contre incapable de différencier les isomères comme par exemple le glucose, le mannose ou le galactose. Pour déterminer la composition exacte, il faudra avoir recourt à des méthodes d'hydrolyse ou de méthanolyse et à une analyse des produits dérivés par GC/MS.

Les analyses en spectrométrie de masse de glycannes libres et d'oligosaccharides sont le plus souvent décrites dans la littérature par l'utilisation de la technique FAB. Ces molécules sont difficiles à désorber et à ioniser car étant très hydrophiles, elles se retrouvent en solution dans les matrices plutôt qu'en surface prêtes à être désorbées et ionisées. De plus, l'absence de site basique nécessite une ionisation par complexation avec des cations alcalins (Egge *et al.*, 1987). Les méthodes de dérivation des oligosaccharides, telles que la perméthylation, la peracétylation et la dérivation par amination réductive, ont montré que l'augmentation du caractère hydrophobe des molécules par dérivation améliore la désorption et l'ionisation, et permet ainsi d'augmenter le signal de manière significative.

### Oligosaccharides peracétylés et perméthylés

Comme le montre une abondante bibliographie, la majeure partie des études en spectrométrie de masse d'oligosaccharides est effectuée sur des structures dérivées soit par peracétylation soit par perméthylation. Dell (1987, 1990) et Egge *et al.* (1987) décrivent les divers avantages qu'apportent ces méthodes, notamment en spectrométrie de masse en mode FAB où le caractère hydrophobe des groupes O-méthyles et O-acétyles favorise la désorption et l'ionisation. Les conséquences sont alors une augmentation du signal et du seuil de détection.

#### *Peracétylation*

La peracétylation est une bonne méthode de substitution des oligosaccharides qu'ils soient purs ou contaminés par exemple par des sels. Le mélange anhydride trifluoroacétique/acide acétique (2/1 v/v) ou pyridine/anhydride acétique (1/1 v/v) permettent une substitution rapide

et quantitative des hydroxyles libres en milieu acide ou basique. Le second protocole est préconisé dans le cas d'oligosaccharides à groupements acido-labiles comme le sulfate.

La peracétylation implique une forte augmentation de masse moléculaire car l'incrément de masse est de  $n \times 42$  Da,  $n$  étant le nombre d'hydroxyles substitués. Cette méthode de dérivation d'oligosaccharides ou des glycanes libres améliore la réponse lors de l'ionisation par FAB (Egge *et al.*, 1987), par MALD (Harvey, 1993) et par ES (Metzger *et al.*, 1991).

L'analyse par FABMS/MS d'oligosaccharides peracétylés produit des spectres faciles à interpréter où les ions majoritaires résultent de la rupture des liaisons glycosidiques. Cette méthode permet de déterminer la séquence d'un oligosaccharide et la localisation d'un résidu plurisubstitué par absence de certains ions (Domon *et al.*, 1990).

### *Perméthylation*

La méthylation est la plus classique des techniques de dérivation en vue d'une analyse en spectrométrie de masse. Souvent considérée comme fastidieuse, elle apporte stabilité thermique, volatilité aux molécules dérivées et une plus faible augmentation de masse ( $n \times 14$ ) que la peracétylation.

Le principe de méthylation le plus couramment utilisé de nos jours est celui de Ciucanu et Kerek (1984), il s'agit d'une variante du protocole développé par Hakomori en 1964. Ce dernier est encore utilisé dans le cas particulier d'oligosaccharides sulfatés ou à acide uronique. Des informations supplémentaires sur les méthodes de méthylation seront données dans le paragraphe 2. 3. 4..

La technique FABMS permet d'élucider la structure d'oligosaccharides perméthylés de masse moléculaire jusqu'à 2.500 Da (Egge *et al.*, 1987). La perméthylation est une méthode permettant également d'augmenter la réponse des oligosaccharides lors de leur analyse par MALD (Garrozzo, 1995) et par ES (Metzger, 1991).

La méthylation est une étape indispensable comme nous le verrons plus loin à la détermination des points de branchements d'oligosaccharides ou de glycanes par la technique de couplage GC/MS en impact électronique des alditols acétates partiellement méthylés (Lindberg, 1972) et des méthyl-glycosides partiellement acétylés (Fournet *et al.*, 1981) ou par GC/MS/MS des méthyl-glycosides éthanolysés et deutérométhylés (Dubreucq *et al.*, 1996).

## Oligosaccharides dérivés par amination réductive

En 1978, Hase *et al.* décrit la fixation d'un chromophore ou d'un fluorophore sur l'extrémité réductrice d'oligosaccharides afin d'en optimiser la détection dans l'ultraviolet lors d'étapes chromatographiques.

L'extrémité réductrice d'un monosaccharide ou d'un oligosaccharide en solution se trouve en équilibre entre sa forme cyclique (hémiacétal) et sa forme linéaire (aldéhyde). Cette dernière réagit avec l'amine primaire du chromophore ou du fluorophore afin de former une base de Schiff. La réaction étant réversible, une étape de réduction permet alors de stabiliser le dérivé formé en transformant la base de Schiff en une amine secondaire stable (Figure 13).

Les avantages de la dérivation des oligosaccharides par amination réductive sont les suivants:

- le marquage sélectif des extrémités réductrices,
- le caractère aromatique du dérivé permet une détection beaucoup plus sensible dans l'UV ou par fluorescence des oligosaccharides par rapport à l'indice de réfraction, ce dernier étant de plus incompatible avec l'utilisation d'un gradient de solvant en chromatographie liquide (Yamashita *et al.*, 1982; Hase *et al.*, 1984a et b),
- le caractère hydrophobe des dérivés formés permet leur analyse en HPLC en phase inverse et ceci avec une meilleure résolution par rapport aux oligosaccharides natifs (Takemoto *et al.*, 1985; Poulter *et al.*, 1990 et 1991),
- l'hydrophobicité augmente le seuil de détection en spectrométrie de masse (Wang *et al.*, 1984) et favorise la fragmentation (Poulter *et al.*, 1990 et 1991; Gillece-Castro *et al.*, 1990b)
- les dérivés chargés, comme par exemple par l'acide 8-amino-1,3,6-naphtalène tri sulfonique (ANTS), peuvent être séparés et visualisés par électrophorèse (Système "FACE" pour Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis) (Hu *et al.*, 1994; pour revue: Jackson, 1994).
- les dérivés sont stables vis-à-vis de l'hydrolyse acide ou alcaline et sont donc compatibles avec des conditions d'analyse structurale.

Les chromophores et fluorophores les plus couramment utilisés sont représentés dans la Figure 14.

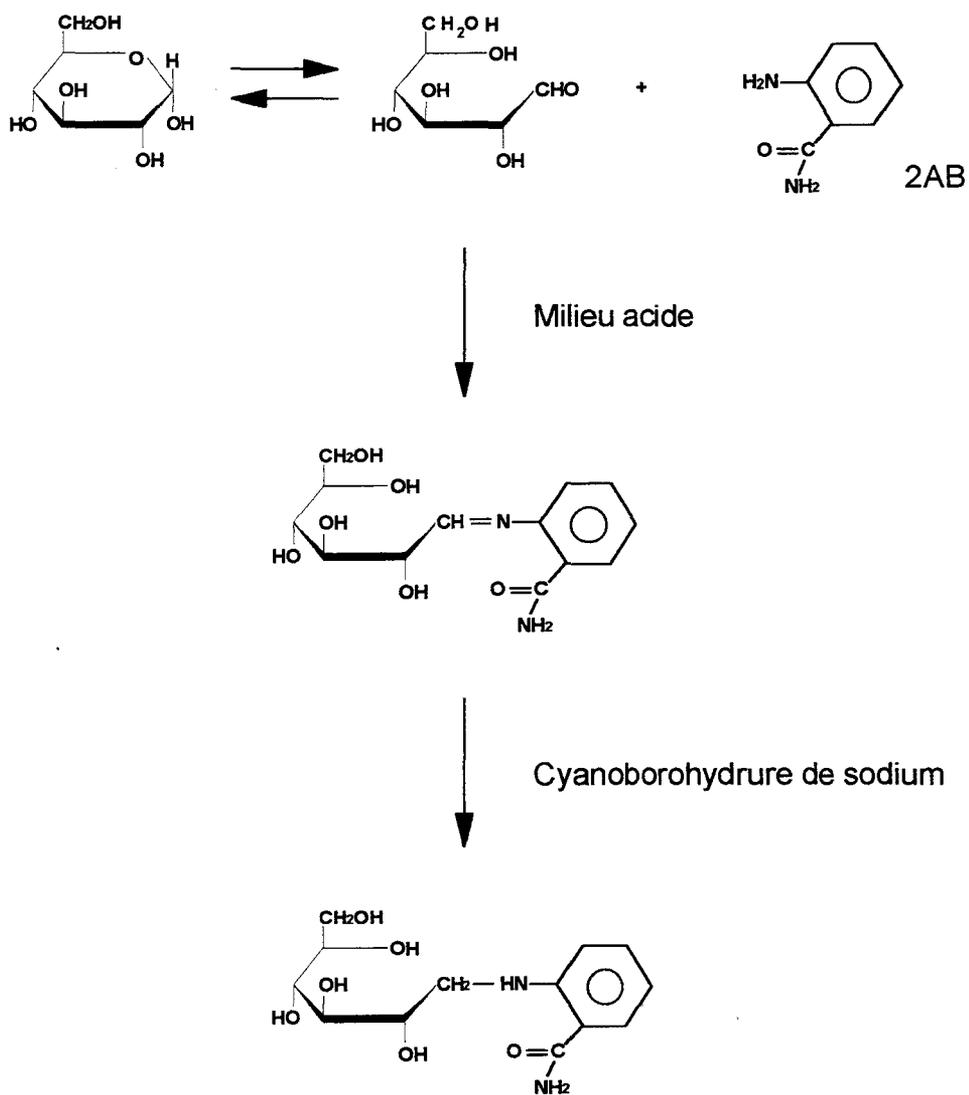
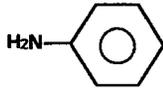
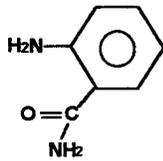


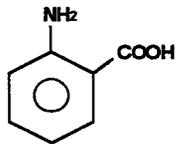
Figure 13: Schéma réactionnel de la réaction d'amination réductive avec le 2-aminobenzamide



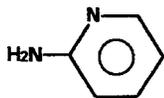
**Aniline**



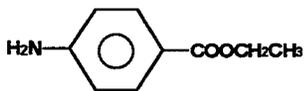
**2-aminobenzamide (2AB)**  
(Bigge *et al.*, 1995)



**Acide anthranilique**  
(Bigge *et al.*, 1995)



**2-aminopyridine (2AP)**  
(Honda *et al.*, 1989)



**p-aminobenzoate d'éthyle (ABEE)**  
(Poulter *et al.*, 1991)

Figure 14: Nom et structure de quelques marqueurs d'amination réductive

## 2. 3. Etude structurale détaillée

La caractérisation par spectrométrie de masse de polymères glucidiques apporte des renseignements sur la polydispersité de l'échantillon et sur le contenu glucidique par calcul des incréments de masse des résidus monosaccharidiques. Elle se poursuit en général par une analyse structurale détaillée qui tentera de définir la nature des monosaccharides, le type de liaison, la séquence, les points de ramification, la configuration des carbones anomériques et la substitution non glucidique potentielle. Des méthodes spectroscopiques comme la résonance magnétique nucléaire et l'infrarouge peuvent renseigner, en première approche, sur les caractéristiques structurales de l'échantillon mais la détermination structurale détaillée est réalisée grâce à des méthodes chimiques.

### 2. 3. 1. Résonance magnétique nucléaire et infrarouge

#### *Résonance magnétique nucléaire*

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton est la méthode non destructrice la plus puissante pour l'étude de la structure des monosaccharides et des oligosaccharides. En principe, l'analyse peut fournir tous les renseignements nécessaires à l'établissement de la séquence d'un oligosaccharide ou d'un glycanne libre. Il est donc possible de déterminer: la composition qualitative et quantitative d'un oligosaccharide c'est-à-dire le nombre et la nature de chacun des monosaccharides, la configuration pyranique ou furanique des cycles, l'enchaînement des monomères, la nature de la liaison (1-2, 1-3, 1-4 ou 1-6), la configuration de la liaison  $\alpha$  ou  $\beta$ , le nombre, la position et la nature des substituants non glucidiques tels que les groupes sulfate, phosphate ou acétate (Vliegthart *et al.*, 1983; Bush, 1988; Jones, 1991; Jones *et al.*, 1993).

D'autre part, la RMN du proton et du carbone 13 sont généralement aussi utilisées pour la détermination semi-quantitative du taux de branchement de l'amidon, de dextrans limites et du glycogène (Dias *et al.*, 1982; Gidley, 1985). En effet, l'intensité du signal RMN représentée par la surface du pic est proportionnelle au nombre relatif de noyaux entrant en résonance dans des conditions expérimentales précises. La détermination du taux de branchement par RMN du carbone 13 est tributaire de facteurs limitants. D'une part, la faible solubilité des polymères de haute masse demande des temps d'acquisition longs afin de laisser aux atomes de carbones le temps de se relaxer et d'augmenter ainsi le rapport signal/bruit.

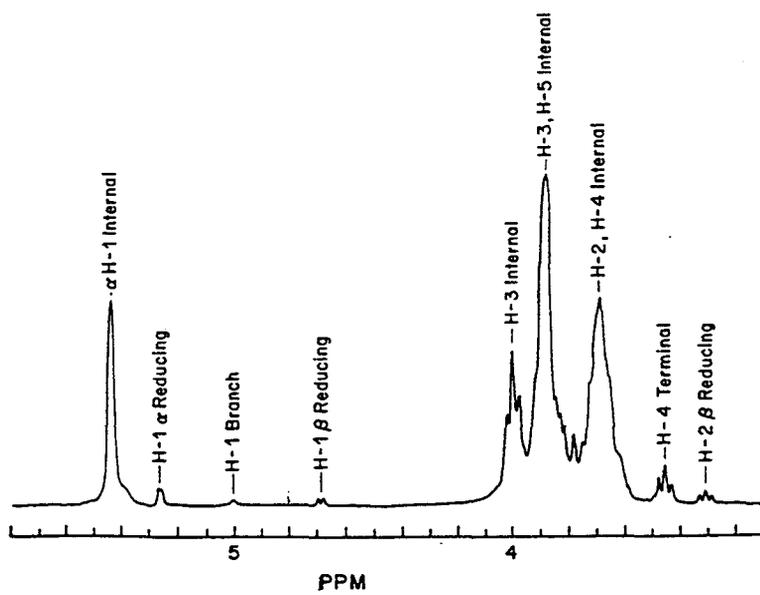


Figure 15: Spectre RMN du proton d'une maltodextrine dans une solution de  $D_2O$   
 (D'après Mc Intyre, 1990)

D'autre part, la superposition des signaux correspondant aux carbones anomériques rend parfois difficile l'intégration des surfaces de pics. Aussi, la quantification du taux de branchement par RMN du proton est plus souvent utilisée dans les analyses de routine. Dans ce cas, le rapport des surfaces de pics correspondant aux protons H<sub>1</sub> d'une liaison (1-6) sur la somme des protons H<sub>1</sub> des liaisons (1-6) et des liaisons (1-4) permet l'estimation du taux de branchement du polymère glucidique. Notons que l'analyse de polymères de DP supérieurs à 20 ne donne que des résultats semi-quantitatifs (McIntyre *et al.*, 1990).

La possibilité de déterminer l'ensemble de la structure glucidique d'une molécule par cette méthode spectroscopique possède tout de même des limites dont la quantité (quantité minimale de l'ordre du mg) et la pureté du matériel glucidique étudié. Les spectres RMN sont donc très riches en informations mais il reste bien souvent des massifs non résolus dans le cas d'oligosaccharides complexes. Une attribution complète du spectre RMN du proton requiert l'utilisation de techniques RMN à 2 dimensions (2D) et n'est possible que pour des molécules pures. Cette approche n'est donc pas une méthode idéale pour l'étude structurale complète de polymères glucidiques constitués d'oligosaccharides de natures chimiques différentes en mélange comme dans le cas du polydextrose mais elle permet tout de même de se rendre compte de l'hétérogénéité structurale du polymère, d'apporter quelques éléments de structure et de réaliser une empreinte du produit (Figure 15).

### *Infrarouge*

La spectrométrie infrarouge est utilisée principalement pour l'analyse de molécules en vue de la confirmation de son identité par comparaison avec des spectres standards. Sur un oligosaccharide de structure inconnue, cette technique renseigne sur les fonctions chimiques présentes. Les liaisons O-H, C-H, C-O et vibrent respectivement à 3000, 2800-3000 et 1000-1200 <sup>cm<sup>-1</sup></sup>.

## 2. 3. 2. Hydrolyse totale et dégradation partielle

### *Hydrolyse totale de polysaccharides*

L'hydrolyse totale d'un polysaccharide a pour objectif une hydrolyse quantitative des résidus saccharidiques afin de les identifier et de les quantifier lors d'analyses ultérieures. Les protocoles les plus courants qui utilisent des acides concentrés sont les suivants: acide sulfurique 0,25 M, 18 heures à 100°C (Lundblad *et al.*, 1986) et acide trifluoroacétique 4M, 4

heures à 100°C (Anumula *et al.*, 1991). Les différentes liaisons glycosidiques en (1-2), (1-3), (1-4) et (1-6) ont des taux d'hydrolyse peu différents. Dans ces conditions, les acides sialiques sont détruits et les N-acétyl-hexosamines désacétylées. Les résidus les plus résistants sont les 2-amino-2-désoxyoses car ils sont stabilisés par la formation d'un ammonium, et les acides uroniques. Ces derniers se retrouvent à l'issue de la réaction dans des structures disaccharidiques en position terminale non réductrice. La stratégie consistant en une réduction préalable des groupements carboxyliques par le KBD<sub>4</sub> du polysaccharide permet une hydrolyse quantitative dans les conditions précédemment citées (Taylor et Conrad, 1972; York *et al.*, 1985; Quintero *et al.*, 1989).

### *Hydrolyse partielle*

La méthode la plus courante de détermination de séquence de polysaccharides est basée sur l'hydrolyse acide partielle suivie d'un fractionnement et d'une identification de la structure résiduelle. Les conditions d'hydrolyse ménagée consistent en des concentrations en acide plus faibles par rapport aux conditions d'hydrolyse totale. Cette méthode est couramment utilisée pour cliver sélectivement des liaisons avec des résidus de fucose (Kotchetkov *et al.*, 1976), d'acides sialiques (Schauer, 1978; Varki *et al.*, 1984) ou des résidus acido-labiles en faible proportion dans la structure glycosidique. Ces liaisons acido-labiles lient généralement des sucres de configuration furanique ou des désoxy-sucres.

Les résultats d'hydrolyse partielle d'oligosaccharides de bas poids moléculaire ne sont pas nécessairement extrapolables aux polymères (BeMiller, 1967). Dans de tels cas, les conditions d'hydrolyse partielle doivent être tout d'abord étudiées, puis l'analyse structurale des produits partiellement méthylés avant et après hydrolyse partielle révèle la nature de la substitution (Hellerqvist *et al.*, 1968).

### 2. 3. 3. Analyse par GC/MS des produits de dégradation

#### *Ionisation par impact électronique (EI)*

La source à impact électronique est la source la plus utilisée en spectrométrie de masse organique. Elle est constituée d'un filament chauffé qui émet des électrons. Ces derniers sont accélérés vers une anode et entrent en collision avec les molécules en phase gazeuse de la source. L'ionisation par impact électronique produit l'ion moléculaire et des fragments. Le nombre d'ions maximum produit par un courant électronique donné, à pression constante, se

situe vers un potentiel d'accélération de l'ordre de 70 eV. Il a été démontré que le nombre d'ions positifs est environ 1000 fois supérieur à celui des ions négatifs, ce qui explique pourquoi seuls ceux-ci sont considérés lors des analyses en impact électronique.

### *Ionisation chimique (CI)*

L'ionisation chimique (Harrison, 1983) consiste à produire des ions par collision de la molécule à analyser avec des ions présents dans la source et provenant d'un gaz réactant. A l'intérieur de celle-ci règne une pression de l'ordre de 60 Pa (supérieure à la pression d'une source en EI) afin de favoriser les collisions. La quantité de gaz réactant est très en excès par rapport à la quantité de substance à analyser. Un électron émis par le filament ionisera préférentiellement le gaz réactant par impact électronique et les ions ainsi produits entreront en collision avec d'autres molécules de gaz et induiront la formation des ions réactants. L'ionisation de la substance à analyser résulte alors de la collision entre ces ions réactants et les molécules de l'échantillon par des réactions de transfert de protons, d'abstraction d'hydrure, d'addition, de transfert de charge et de capture d'électrons thermalisés.

Lors de l'ionisation chimique, les spectres sont caractérisés par l'espèce moléculaire intense du fait d'une fragmentation limitée.

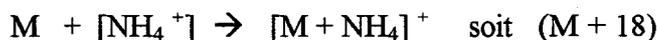
Le méthane (CH<sub>4</sub>), l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) et l'isobutane (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>) sont les gaz ionisants les plus couramment utilisés. Les réactions produisant l'ionisation par les gaz réactants sont détaillées ci-dessous.

#### *Cas du méthane*

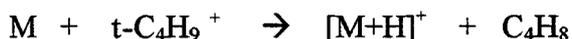
Les ions observés résultent de la formation d'adduits ion-molécule par réaction acido-basique selon le schéma réactionnel suivant:



#### *Cas de l'ammoniac*



#### *Cas de l'isobutane*



Les spectres issus de l'ionisation chimique sont caractérisés par les ions cités précédemment et présentent quelques particularités en fonction du gaz réactant utilisé. Dans

le cas du méthane, les espèces moléculaires sont plus facilement soumises à la fragmentation; alors qu'en présence d'ammoniac, les deux espèces moléculaires  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$  sont présentes, sans fragmentation mais le rapport de surface des pics entre ces deux espèces est variable en fonction de la nature du sucre et de sa dérivation. Dans le cas d'une approche semi-quantitative par GC/MS en mode CI, l'isobutane est alors préconisé, car les ions réactants  $t-C_4H_9^+$ , représentant plus de 90% du courant ionique total, réagissent comme des acides faibles et donnent des spectres caractérisés par une seule espèce moléculaire  $[M+H]^+$  et une faible fragmentation.

#### 2. 3. 4. Méthodes de méthylation

Comme nous l'avons vu précédemment dans le paragraphe 2. 2. 2. , la méthylation est une des méthodes de dérivation des oligosaccharides et des glycanes en vue de leur analyse par spectrométrie de masse. Cette méthode est aussi une technique de dérivation classique des sucres dans le but de les rendre volatils pour une analyse par GC et GC/MS lors notamment de la détermination des liaisons osidiques.

En 1964, Hakomori applique une nouvelle méthode de méthylation dans le but de méthyler de façon quantitative des polysaccharides et des groupements acétamido. Le principe met en jeu l'hydrure de sodium (NaH) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) réagissant entre eux pour former le carbanion diméthylsulfinyle qui déprotonne les fonctions hydroxyles libres pour former des alcoolates ( $RO^- Na^+$ ). Une seconde étape consiste à faire réagir l'iodure de méthyle ( $CH_3I$ ) afin d'étherifier les alcoolates. Ce protocole permet une complète O et N-méthylation des oligosaccharides issus de glycoprotéines, de glycosphingolipides ou de polysaccharides.

Pourtant des techniques nouvelles de méthylation ont été avancées afin d'améliorer la sensibilité des dérivés méthylés en chromatographie en phase gazeuse en raison de la contamination de l'hydrure de sodium par de la paraffine. Toutes les méthodes de méthylation suivent le même schéma réactionnel, seule la base qui réagit avec le DMSO change afin de former le carbanion diméthylsulfinyle. En 1980, Finne *et al.* utilise le *t*-butoxyde de potassium; en 1981, Phillips *et al.*, le dimsyl de potassium et en 1985, Paz Parente *et al.*, le butyl-lithium.

De nos jours, la méthode la plus utilisée est sans nul doute celle décrite, en 1984, par Ciucanu et Kerek, qui utilise la soude (NaOH) ou la potasse (KOH) dans le DMSO. Cette

méthode est de plus préconisée pour les oligosaccharides de petite taille (jusqu'à 10 monosaccharides). Pourtant il est impératif de connaître la particularité de cette méthode lorsque l'on travaille sur des polysaccharides à acides uroniques. La fonction carboxylique en 6 de l'acide uronique est rapidement estérifiée en méthyl ester et devient alors le lieu privilégié d'une réaction de  $\beta$ -élimination classique due à la présence de soude, provoquant ainsi une libération du substituant en 4. L'oligosaccharide perméthylé possède alors un perméthyl 4-déoxysucre terminal (Gunnarsson, 1987). La  $\beta$ -élimination catalysée par une base d'hexuronate substitués en 4 est une réaction couramment utilisée lors d'élucidation structurale de polysaccharides bactériens (Lindberg *et al.*, 1975). Il est à noter que le phénomène de  $\beta$ -élimination lors de la réaction de méthylation est beaucoup moins important avec le protocole d'Hakomori.

### 2. 3. 5. Méthode de Lindberg

L'application la plus classique de la méthylation est la méthode de Lindberg qui consiste en une détermination structurale des points de substitution des monosaccharides au sein de polysaccharides ou de glycanes issus de glycoconjugués (Lindberg, 1972).

Après une étherification des hydroxyles libres de l'oligosaccharide par méthylation, une hydrolyse acide libère des monomères partiellement méthylés pour lesquels les hydroxyles libérés correspondent aux liaisons glycosidiques de l'oligosaccharide natif. Cette méthode ne renseigne ni sur la séquence des monomères ni sur l'anométrie des liaisons. Chaque monosaccharide méthylé donne théoriquement quatre méthyl-glycosides ( $\alpha$ - et  $\beta$ -pyranoside et / ou  $\alpha$ - et  $\beta$ -furanoside). Cette multiplicité de pics peut parfois faciliter l'interprétation de mélanges simples mais représente un réel désavantage lors de mélanges complexes. Une réduction suivie d'une acétylation permettent l'alternative des alditols acétates (Figure 16) qui sera de ce fait privilégiée car chaque méthyl-glycoside réduit donne un seul alditol acétate facilement identifiable par son temps de rétention en GC (Björndal *et al.*, 1967; Lindberg, 1972, 1975 et 1978; Geyer *et al.*, 1994). Une analyse semi-quantitative des alditols acétates partiellement méthylés (PMAA) peut être également envisagée car la détection FID (*flame ionization detector*) donne une surface de pics proportionnelle à la concentration. Pourtant, seuls les dérivés de même nature (hexose, pentose...) possèdent une réponse molaire identique par opposition aux espèces mono- di- ou tri-acétylées qui présentent des coefficients de

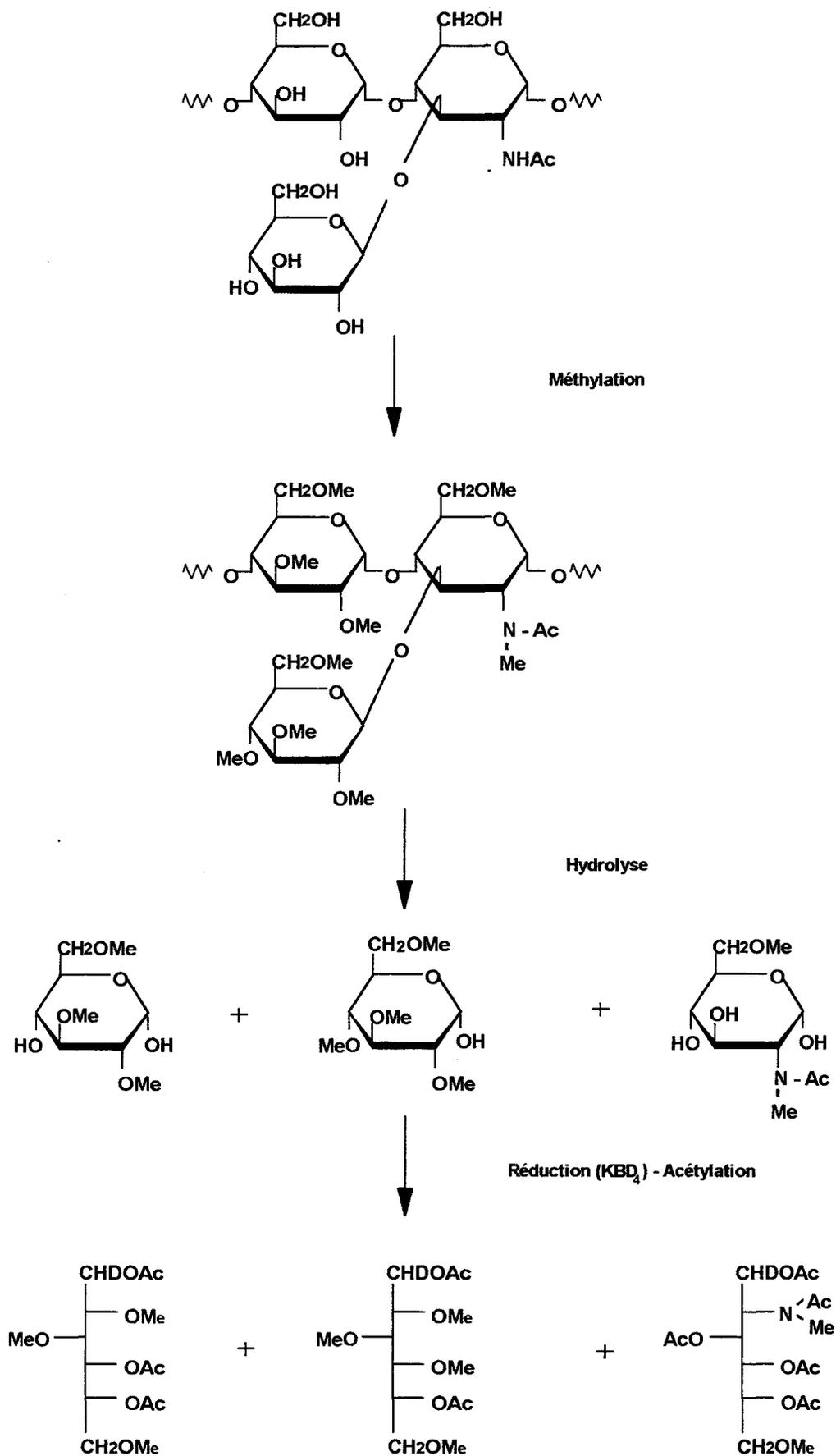


Figure 16: Méthode de Lindberg - Principe d'obtention des alditols acétates partiellement méthylés (PMAA)

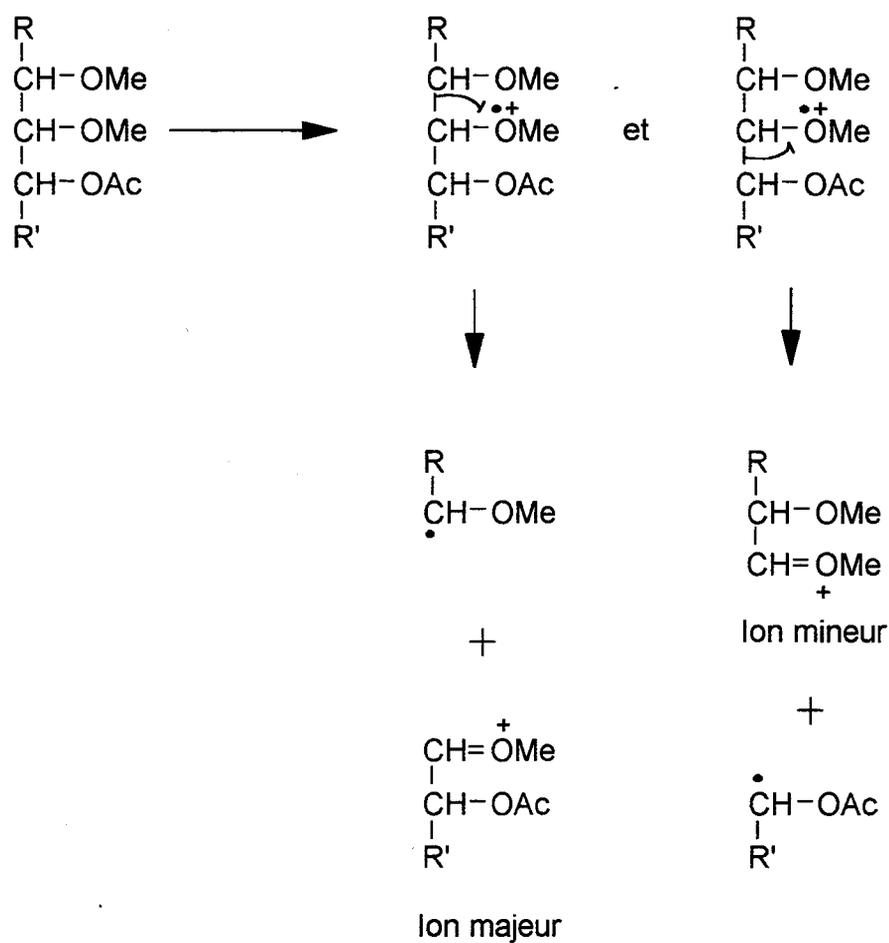


Figure 17: Détails de la fragmentation de la chaîne carbonée d'un alditol acétate entre un carbone substitué par un groupe méthyle et un carbone substitué par un groupe acétyl (Hellerqvist, 1990)

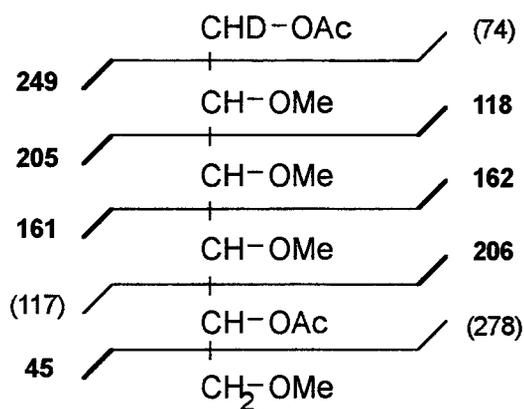


Figure 18: Fragmentations d'un alditol acétate (Hellerqvist, 1990)  
 Les fragments indiqués entre parenthèse sont les moins favorisés.

réponse différents. La confirmation de la substitution de chaque résidu est obtenue par GC/MS en mode impact électronique.

La fragmentation des alditols acétates partiellement méthylés est relativement simple et peut être résumée de la façon suivante: les fragments primaires résultent de la fission privilégiée de la liaison entre deux carbones de la chaîne; la fission entre deux carbones méthyl-étherifiés est favorisée par rapport à la rupture de liaison entre un atome de carbone O-méthylé et un atome de carbone O-acétylé (Figures 17 et 18); les fragments secondaires sont issus des fragments primaires par perte d'acide acétique ( $m/z$  60), de cétène ( $m/z$  42), de méthanol ( $m/z$  32) ou de formaldéhyde ( $m/z$  30) (Hellerqvist, 1990).

La réduction est généralement réalisée grâce au borodutériure de potassium ( $KBD_4$ ) afin de différencier les alditols acétates de même degré de substitution en marquant spécifiquement le carbone 1 de chaque méthyl-glycoside.

Une alternative intéressante de la méthode de Lindberg a été apportée par Fournet *et al.*, en 1981, dans laquelle l'hydrolyse et la réduction ont été remplacées par une étape de méthanolyse (Figure 19). La libération des monosaccharides neutres, des hexosamines, des acides uroniques et des acides sialiques nécessite en effet des conditions d'hydrolyse différentes. De plus, l'hydrolyse peut être responsable de dé-O-méthylation et de destruction de sucres acido-labiles comme les acides sialiques. La méthanolyse est capable, par contre, de libérer toutes les classes de sucres en une seule étape et sans dégradation (Chaplin, 1982). Les méthyl-glycosides formés sont plus stables que les alditols et l'étape souvent pénible d'élimination des borates issus de la réaction de réduction est ainsi évitée. La méthanolyse induit la formation des isomères (anomères  $\alpha$  et  $\beta$  des formes pyranique et furanique), cette multiplicité de pics permet d'attribuer par GC chaque espèce, sans erreur, grâce au temps de rétention et au rapport d'intensité des pics. Une analyse semi-quantitative est possible malgré les coefficients de réponse différents des espèces mais présente une réelle difficulté au niveau de l'intégration des surfaces de pics lors de co-élutions. Les méthyl-glycosides partiellement méthylés et acétylés sont ensuite analysés par GC/MS afin de déterminer les points de substitution. Les fragments caractéristiques les plus caractéristiques des méthyl-glycosides partiellement acétylés différemment substitués sont détaillés dans la Figure 20.

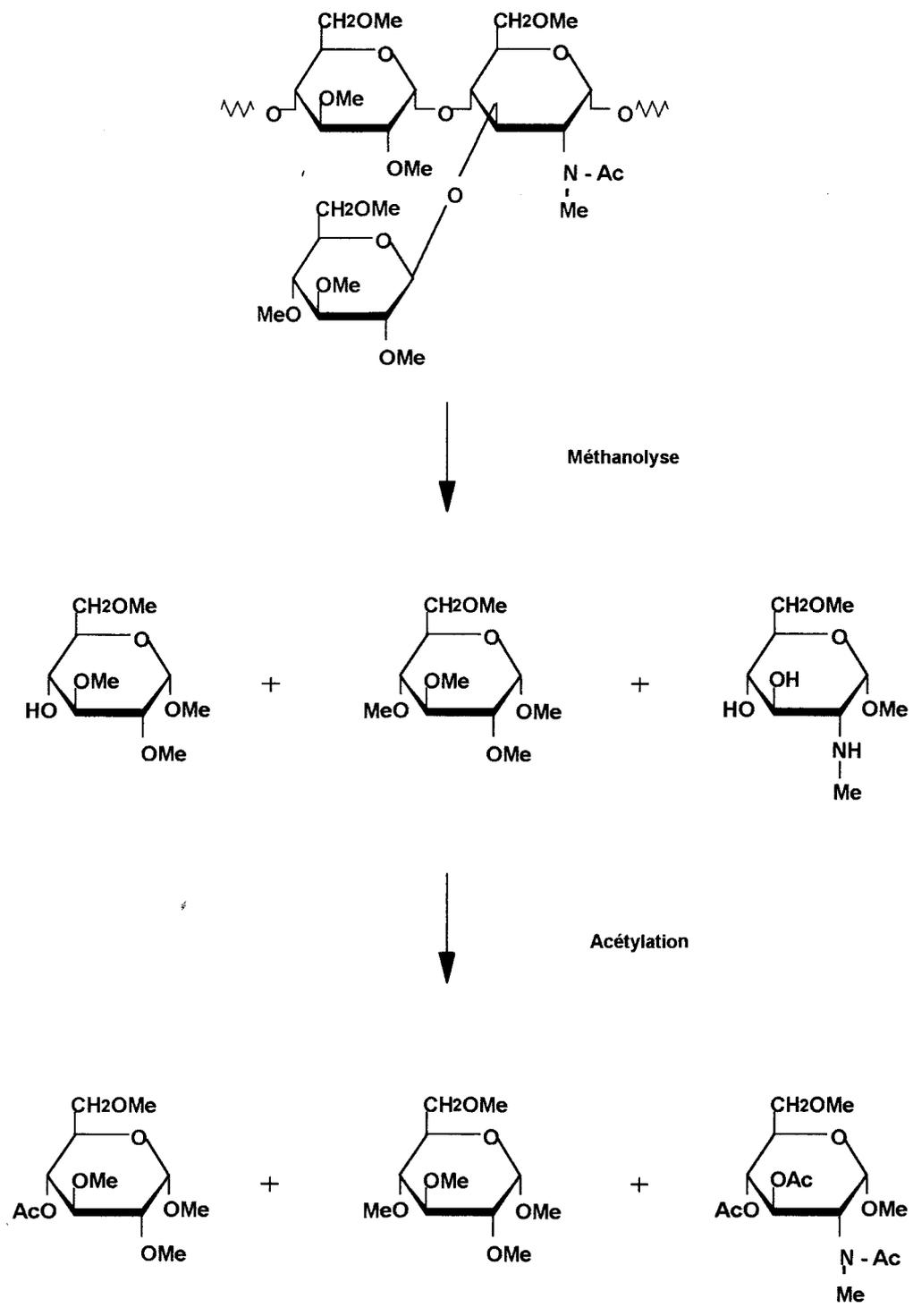
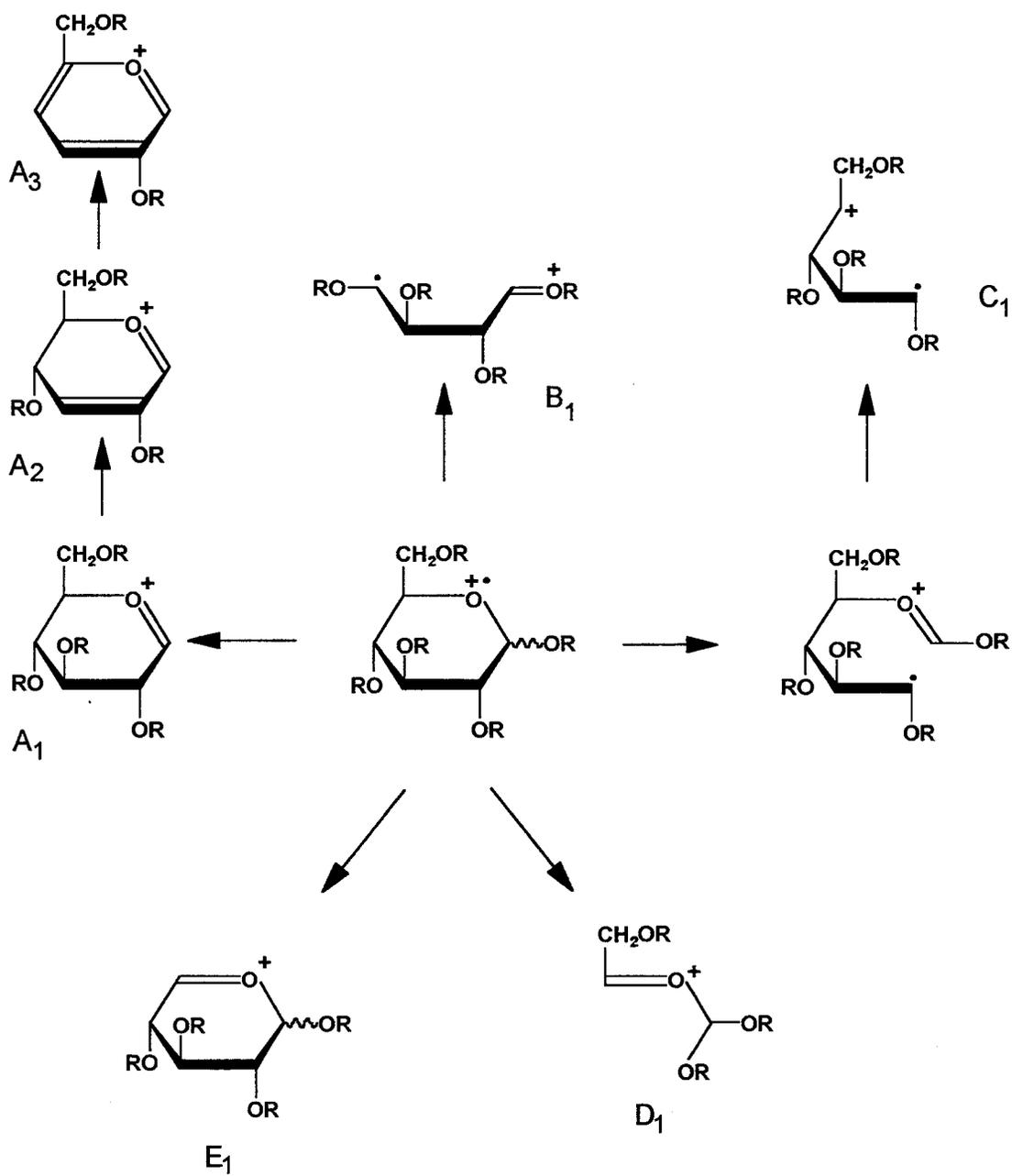


Figure 19: Principe d'obtention des méthyl- glycosides partiellement méthylés et acétylés (Fournet, 1981)



**R = Me ou Ac**

Figure 20: Principales voies de fragmentation des méthyl-glycosides partiellement méthylés et acétylés (Fournet, 1981)

### 2. 3. 6. Dégradation de Smith

La dégradation de Smith est une méthode couramment utilisée pour l'approche structurale de polysaccharides basée sur la réaction d'oxydation périodique (Smith *et al.*, 1961). L'oxydation périodique réalise un clivage oxydatif des liaisons carbone-carbone situées entre deux diols vicinaux. Elle est suivie d'une réduction au borohydrure de potassium, puis d'une hydrolyse douce (Figure 21). Etant donné que le reste de la structure reste intact à l'issue de l'oxydation périodique et que l'hydrolyse douce n'atteint pas les liaisons osidiques, cette méthode permet de déterminer les isoméries de position entre les monosaccharides constitutifs d'une structure complexe. Cette méthode a été réactualisée dans le contexte de la spectrométrie de masse (Angel *et al.*, 1987 et 1990).

### 2. 3. 7. Mise en évidence des groupes endogènes

#### *Groupes O-méthyles*

Les méthyl-glycosides sont des composants courants des polysaccharides qui contiennent aussi bien souvent leur homologue non O-méthyle. La méthylation avec le trideutéroiodométhane ( $CD_3I$ ) permet de distinguer par spectrométrie de masse ces deux types de sucres. La combinaison méthylation, hydrolyse et éthylation permet aussi de déterminer la substitution de dextrans partiellement méthylés (Larm *et al.*, 1971).

#### *Groupes O-acétyles*

La localisation de groupements acétyles dans des polysaccharides partiellement acétylés n'est pas simple. En effet, les groupements acétyles sont non seulement hydrolysés dans des conditions basiques mais instables en milieu acide (Bonner, 1959). En 1961, Bouveng a mis au point une méthode de protection des hydroxyles libres par de l'isocyanate de phényle. Une hydrolyse sélective des groupements acétyles, une méthylation, une déprotection des hydroxyles et une hydrolyse totale permettent de positionner les substituants acétyles marqués par les groupements méthyles. Cette méthodologie a été appliquée à la cellulose (Leigh *et al.*, 1966) partiellement acétylée. Malheureusement, ces conditions sont favorables à une dépolymérisation et à une déméthylation, toutes deux indésirables. En 1968, DeBelder *et al.* décrivent une méthodologie basée sur la substitution des hydroxyles libres par l'éther méthylique de vinyl et cette technique appliquée à des dextrans partiellement acétylés pallie

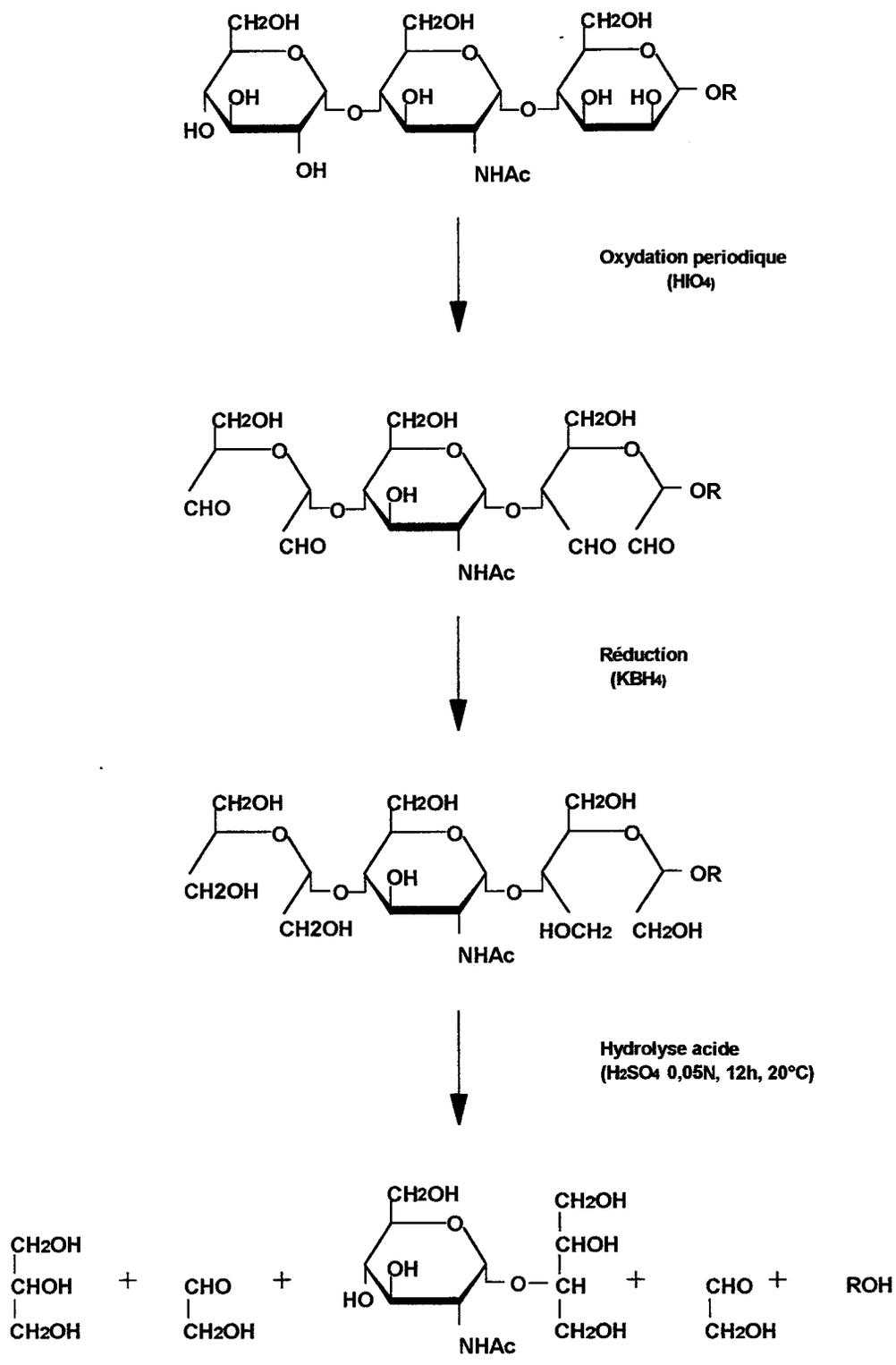


Figure 21: Principe de la dégradation de Smith

ces inconvénients. D'autres auteurs ont par ailleurs préconisé l'utilisation du groupement méthoxy-éthoxy-méthyle (MEM) stable en milieu alcalin et donc lors d'une étape de méthylation. Cette approche a été appliquée pour caractériser les lactones (Leverly *et al.*, 1989 et 1990).

---

## **Chapitre 3**

### **Résultats et Discussion**

---

## CHAPITRE 3. Mise au point de méthodologies sur des oligosaccharides de référence en vue d'une caractérisation par spectrométrie de masse

La caractérisation par spectrométrie de masse de polymères permet l'obtention d'une vision globale de la distribution des masses moléculaires ainsi que de mener à bien une analyse structurale des composants du polymère. Cette polyvalence ne se retrouve pas avec les autres techniques plus classiques comme la chromatographie de filtration sur gel, la RMN ou l'osmométrie. Une littérature florissante décrit l'analyse de nombreux polymères synthétiques par spectrométrie de masse par FAB (Lattimer, 1992 et 1994), MALD (Bahr *et al.*, 1992; Danis *et al.*, 1993) et par ES (Prokaï *et al.*, 1993). Par contre, aucune référence ne fait mention d'une étude de la distribution de polymères glucidiques par ces techniques.

Le but de notre travail a été de caractériser par spectrométrie de masse des polymères glucidiques de type maltodextrine, commercialisées sous le nom générique de Glucidex<sup>®</sup> par la société Roquette, en vue d'une extrapolation vers l'analyse de polymères chimiquement plus complexes tels que les polydextroses.

Nous avons eu la chance d'avoir à notre disposition trois techniques de désorption douce, la FAB et le MALD au Centre commun de mesures de l'Université des Sciences et Technologies de Lille à Villeneuve d'Ascq et l'ES au Centre de Recherche et Développement de la société Roquette à Lestrem, compatibles avec une analyse d'oligosaccharides par leur gamme de masse et leur fragmentation absente ou faible.

Aussi notre démarche a été la suivante : (i) nous placer dans des conditions d'analyses quantitatives, (ii) choisir des échantillons témoins (maltooligosaccharides commerciaux et dextrines) pour optimiser et valider notre approche et enfin (iii) analyser systématiquement les trois techniques de désorption afin de déterminer leurs potentialités, leurs zones de variabilité et leurs limites. Ces études nous ont permis de déterminer des conditions d'analyses reproductibles et représentatives des échantillons. Les résultats ont été comparés à ceux issus des techniques dites classiques.

### 3. 1. Caractéristiques d'une étude quantitative par spectrométrie de masse

Le but d'une analyse quantitative par spectrométrie de masse consiste en l'établissement d'une corrélation entre les signaux transmis par le spectromètre et la quantité de substance

présente dans l'échantillon. Plus particulièrement, une approche quantitative de polymères glucidiques consiste à déterminer les valeurs caractéristiques des polymères que sont le  $\overline{Mn}$ , le  $\overline{Mp}$ , le  $\overline{DP}$  et l'indice de polydispersité  $I$  (définis précédemment dans le chapitre Généralités) afin d'estimer le degré de polymérisation majoritaire du produit et la largeur de l'enveloppe glucidique du polymère. Cependant l'obtention de spectres de masse exploitables pour une analyse qualitative et quantitative dépend d'un certain nombre de facteurs importants dont la limite de détection des signaux, l'étalonnage en gamme de masse, la prise de conscience des sources d'erreur et la nécessité d'une étude statistique pour une interprétation fiable des résultats (De Hoffmann, 1994).

### 3. 1. 1. Limite de détection

La sensibilité représente la quantité minimale d'échantillon qui permet d'obtenir un spectre ayant un bon rapport signal/bruit. Dans le cas particulier de l'analyse quantitative par spectrométrie de masse, on utilise souvent le terme de limite de détection qui représente la quantité minimale d'échantillon nécessaire pour obtenir un rapport signal/bruit de fond au moins égal à 10/1. Atteindre ce rapport est indispensable pour une prise en compte des espèces moléculaires spécifiques du polymère glucidique que l'on étudie. Dans le but d'augmenter ce rapport, diverses approches sont possibles dont l'utilisation des modes d'ionisation douce des techniques d'électrospray et de MALD qui ont l'avantage de présenter une fragmentation rare, une optimisation des conditions d'ionisation pour favoriser les phénomènes de désorption/ionisation ou encore la dérivation des échantillons. Le but commun est d'augmenter le nombre d'ions produits dans la source et de limiter la fragmentation, afin de respecter la répartition glucidique du polymère à étudier.

La durée de balayage dans le cas particulier de l'électrospray ou la durée d'intégration du signal par accumulation du nombre de tirs laser dans le cas du MALD sont des paramètres qui affectent aussi la sensibilité car, plus l'intégration est longue, plus les signaux sont intenses augmentant ainsi le rapport signal/bruit.

### 3. 1. 2. Etalonnage externe

Les analyses quantitatives par spectrométrie de masse, quelle que soit la technique d'ionisation utilisée, doivent être réalisées dans une gamme de concentration en échantillon pour laquelle la relation entre le signal et la concentration de la molécule est linéaire. Pour cela, la méthode de calibration externe consiste en l'introduction d'une concentration

croissante de la substance à doser dans le spectromètre de masse et à l'enregistrement du signal obtenu. De la courbe de calibration  $Intensité\ Relative = f(concentration)$  est déterminée la relation mathématique  $y = ax + b$  où le coefficient de corrélation  $r^2$  dans la zone de linéarité doit être le plus proche de 1.

Pour la calibration en masse, les maltooligosaccharides commerciaux de DP2 à 7 ont été les premiers échantillons utilisés. Par la suite, les maltodextrines Glucidex de différents degrés d'hydrolyse (DE) ont été utilisées afin de déterminer les paramètres  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$  et  $I$  des polydextroses et des polyglucoses.

### 3. 1. 3. Sources d'erreur et étalonnage interne

L'analyse quantitative par spectrométrie de masse proprement dite est précédée en général d'une ou de plusieurs étapes expérimentales. L'erreur finale résulte de l'accumulation des erreurs de chaque étape qui peuvent avoir des proportions différentes en fonction des protocoles utilisés mais aussi des manipulations lors de la préparation des échantillons (précision, pureté, teneur en eau variable...). Une autre source d'erreur est due à l'analyse par spectrométrie de masse elle-même, résultant des variations des conditions d'ionisation dans la source et de l'instabilité de l'échelle de masse. Généralement les erreurs de manipulation sont bien plus importantes que les erreurs dues au spectromètre de masse. Afin de minimiser ces variations et donc pour une plus grande exactitude des mesures, il est préférable de détecter un maximum d'ions en augmentant par exemple le temps de balayage de la gamme de masse donnée ou par accumulation et moyenne des spectres.

Ces sources d'erreur peuvent être contrôlées grâce à l'introduction dans l'échantillon à analyser d'un standard interne et ceci avant toute autre manipulation. La mesure du signal correspondant à l'échantillon n'est plus alors directement prise en compte mais on se réfère au rapport du signal de la substance à analyser sur le signal du standard interne. Le standard interne peut servir d'étalon à la quantification d'un mélange de différents composés. Le choix du standard interne est important car il doit être de nature physico-chimique la plus proche possible de l'échantillon à analyser afin de subir les mêmes pertes lors des étapes de prélèvement et de préparation de l'échantillon en vue de l'analyse par spectrométrie de masse. De ce fait, le rapport échantillon/standard interne reste constant durant toute la procédure. Pour l'ensemble de nos analyses, la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) a été choisie pour plusieurs raisons dont sa pureté, sa nature proche des échantillons, son inertie dans le mélange, sa masse moléculaire qui se trouve dans la région moyenne des répartitions glucidiques des

différents polymères étudiés et qui est de plus différente de la masse moléculaire des composantes des échantillons.

Dans le cas d'une calibration interne, la linéarité entre le rapport des intensités relatives signal/standard interne et la concentration doit être également vérifiée.

### 3. 1. 4. Etude statistique et expression des résultats

Une analyse quantitative doit être validée par l'obtention de mesures possédant une variabilité limitée démontrant ainsi la reproductibilité des résultats. Dans ce but, nous avons effectué les analyses plusieurs fois (au moins trois fois) et calculé la moyenne du rapport des intensités relatives des ions présents sur les différents spectres de masse obtenus. Les valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ ,  $\overline{DP}$  et  $I$  ont été calculées selon les équations développées dans le chapitre Généralités. Pour rappel,

$$\overline{M_n} = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}, \quad \overline{M_p} = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}, \quad \overline{DP} = \frac{\sum n_i DP_i}{n_i} \quad \text{et} \quad I = \frac{\overline{M_p}}{\overline{M_n}}$$

dans lesquelles  $n_i$  est l'intensité relative et  $M_i$  la masse moléculaire de la substance.

Au cours des études suivantes, les tableaux de résultats présenteront les valeurs expérimentales des intensités relatives obtenues, la valeur moyenne et l'écart type afin d'estimer la reproductibilité des analyses.

Lors des calculs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$  et  $I$  des polymères réduits ou dérivés, les résultats seront exprimés directement en terme d'oligosaccharides natifs, c'est-à-dire que les calculs sont effectués avec la masse moléculaire des oligosaccharides natifs afin de pouvoir comparer directement les valeurs des différents polymères glucidiques entre eux et ainsi interpréter l'influence de la modification étudiée (réduction, méthylation ou conditions d'analyse...).

## 3. 2. Préparation des échantillons

Les solutions de maltooligosaccharides en quantité équimolaire et de maltodextrines ont été préparées par introduction de  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) comme standard interne. La quantité de  $\beta$ -CD ajoutée à chaque échantillon provient de la même solution mère et correspond environ au nombre de moles du  $\overline{DP}$  du Glucidex 19. Les solutions ainsi préparées ont ensuite été diluées afin de correspondre aux caractéristiques du spectromètre de masse utilisé.

### 3. 2. 1. Oligosaccharides et maltodextrines natifs

L'étude des oligosaccharides natifs ne demande qu'une préparation par pesée et dilution. Il faut cependant veiller à la bonne solubilité des produits afin de ne pas discriminer la répartition glucidique. Cette remarque est importante et reste valable pour toutes les étapes de préparation des polymères glucidiques.

L'analyse de produits natifs par spectrométrie de masse est très intéressante et reste la plus utilisée en industrie car elle permet une comparaison rapide et sans autre étape de préparation des polymères glucidiques natifs entre eux.

### 3. 2. 2. Oligosaccharides et maltodextrines méthylés

La méthylation est la méthode de dérivation non spécifique la plus utilisée pour l'analyse des oligosaccharides dérivés par spectrométrie de masse. Elle permet l'obtention de dérivés stables et un gain en intensité de réponse important, tout en n'augmentant que faiblement la masse. Les maltodextrines ont subi deux cycles de méthylation afin de ne plus présenter de méthylation incomplète néfaste à une intégration quantitative et représentative des composés présents.

Le standard interne est introduit dans le mélange de maltooligosaccharides ou dans les maltodextrines avant toute autre transformation puis est soumis à la méthylation en même temps que l'échantillon.

### 3. 2. 3. Oligosaccharides réduits

Un coefficient de réponse du sorbitol (glucose réduit) nettement supérieur à celui du glucose lors d'analyses préliminaires par FAB et ES nous a amené à penser que la réduction des oligosaccharides pourrait augmenter la réponse des signaux de façon significative. Comme nous le verrons par la suite, la réduction au  $\text{KBH}_4$  des oligosaccharides s'accompagne d'une libération de sels de borates néfastes à une analyse par spectrométrie de masse. Malgré un nombre important de codistillations au méthanol, la présence résiduelle des sels conduit à des spectres possédant un bruit de fond très important. Afin d'éliminer l'excédent de sels, les échantillons réduits ont été méthylés avant d'être analysés.

Les valeurs des espèces moléculaires  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et  $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$  correspondant aux oligosaccharides de degré de polymérisation, DP1 à 20, natifs et méthylés, sont regroupées dans des tableaux présentés en annexe.

### 3. 3. Analyses par FAB

La technique FAB a été très couramment utilisée pour des études analytiques de peptides, de glucides et de nucléotides. Pour l'analyse de glucides, les spectres de masse résultant de cette technique d'ionisation douce contiennent les signaux correspondant à l'espèce moléculaire. Ces ions permettent de déterminer la masse moléculaire et donc la composition des échantillons. Dans le cadre de la caractérisation de polymères glucidiques, nous avons effectué des études préliminaires sur les maltooligosaccharides commerciaux afin de déterminer les conditions optimales d'analyses pour ensuite aborder les polydextroses, plus complexes.

#### 3. 3. 1. Analyses de maltooligosaccharides

Les maltooligosaccharides, de DP2 à 7 natifs, nous ont servi à tester des matrices afin de déterminer celle qui permettrait d'obtenir un spectre FAB en mode négatif possédant un signal stable dans le temps, un rapport signal/bruit intense représentatif d'une bonne désorption, peu ou pas de fragmentation et si possible une seule espèce moléculaire. Les matrices les plus couramment utilisées pour les oligosaccharides neutres ont été testées comme le glycérol, le mélange thioglycérol/glycérol (50/50 - v/v), les polyéthylènes glycols (PEG 200) ainsi que l'adjonction d'additifs comme le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou la triéthylamine. Le mélange glycérol/eau/triéthylamine (3/2/1 - v/v) nous a permis d'obtenir le spectre de la Figure 22 montrant un mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP3 à 6 caractérisé par l'espèce moléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^-$  et par une diminution rapide du signal en fonction de la masse moléculaire. Ce résultat démontre clairement une discrimination des constituants. L'augmentation de la masse moléculaire de l'oligosaccharide a pour effet de diminuer la désorption. Ce phénomène de discrimination relatif à l'augmentation de la masse moléculaire des oligosaccharides du mélange démontre bien l'impossibilité d'une approche quantitative de polymères glucidiques par cette technique. De plus, en mode négatif, on ne peut éviter la fragmentation représentée par les ions  $[\text{M}-\text{H}-162]^-$  mais aussi  $[\text{M}-\text{H}-324]^-$  se superposant au DP inférieur.

L'autre caractéristique d'un spectre FAB est l'important bruit de fond qui résulte de la matrice. Les ions de matrice sont différents en fonction de la matrice utilisée. Par exemple, dans le cas du glycérol, des clusters déprotonnés à  $m/z (92n - 1)$  ou dans le cas du thioglycérol à  $m/z (108n - 1)$  se retrouvent sur les spectres. Lorsque la matrice est un mélange

Intensité relative

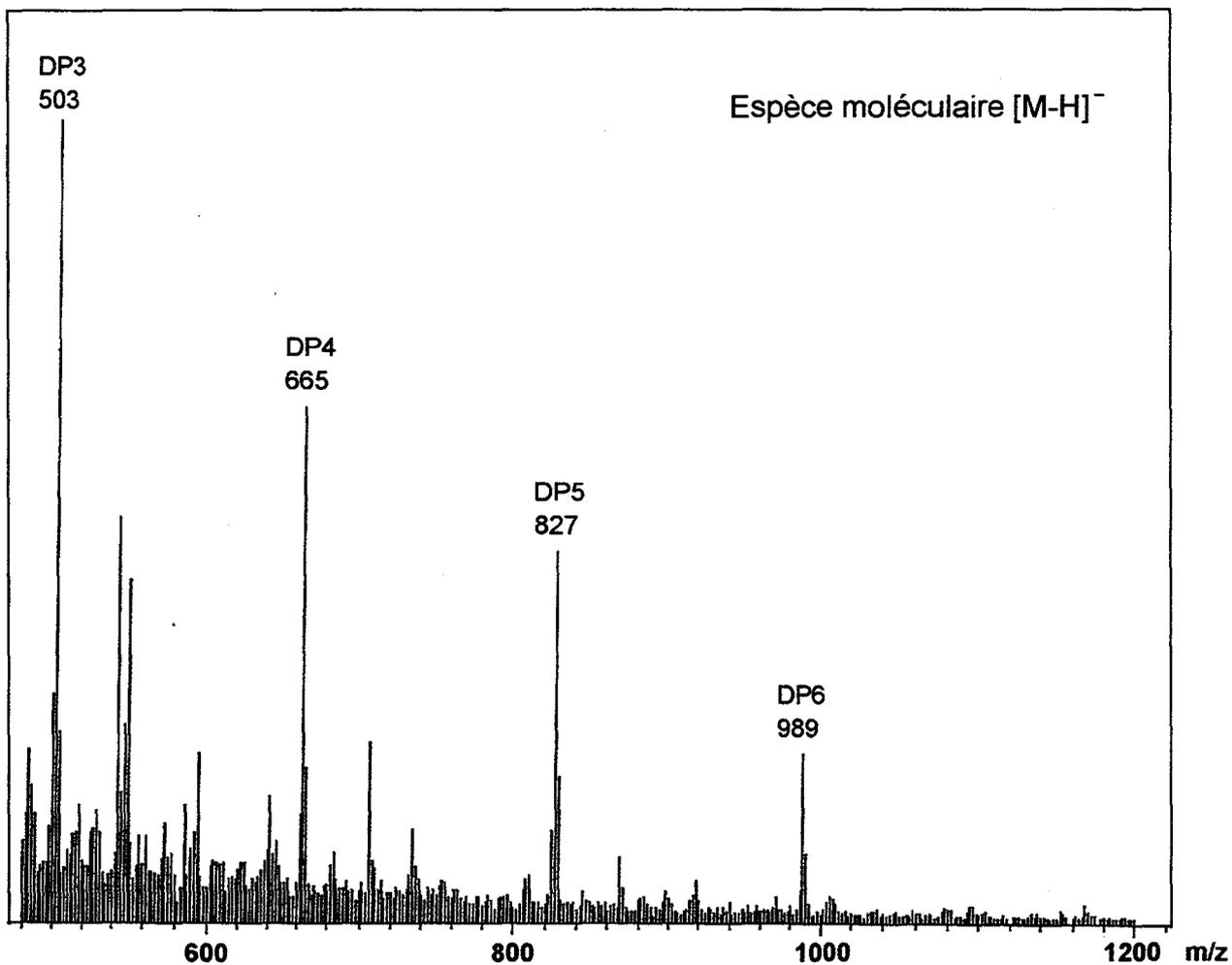


Figure 22: Spectre FAB en mode négatif du mélange équimolaire natif de DP3 à 6

de composants, des clusters correspondant à des combinaisons des différentes espèces en présence augmente encore la multiplicité des pics. Il devient alors difficile de trouver une matrice ne donnant pas de pic de masse correspondant à la masse d'une espèce constitutive du produit.

Pour ces nombreuses raisons mais surtout à cause du phénomène de suppression important, l'utilisation de la technique FAB n'a pas été poursuivie dans le but d'étude quantitative de polymères glucidiques. Cependant une première approche par FAB des polydextroses, nous a apporté des renseignements structuraux très intéressants.

### 3.3.2. Analyses de polydextroses

Le polydextrose Pfizer A natif a été analysé en LSIM (*Liquid Secondary Ion Mass spectrometry*) une variante de la technique FAB qui consiste en un bombardement d'ions césium ( $\text{Cs}^+$ ) accélérés à 30 keV. Cette technique plus sensible, désorbe de plus hautes masses. De ce fait, elle nous a permis d'observer les degrés de polymérisation allant jusqu'à DP14.

D'autre part, la technique FAB renseigne sur la composition en sucres des polymères. Le spectre du polydextrose Pfizer A natif, en mode négatif, dans la matrice glycérol/eau/triéthylamine, présente les ions  $[\text{M}-\text{H}]^-$  égaux à 503, 505 et 485 correspondant respectivement aux composés  $(\text{glucose})_n$ ,  $(\text{glucose})_{n-1}$  - sorbitol et  $(\text{glucose})_{n-1}$  - anhydroglucose du DP3. Les trois familles semblent être présentes à chaque DP. Ces résultats sont confirmés par le spectre en mode positif du produit perméthylé, obtenu en utilisant une matrice de thioglycérol/acétate de sodium 0,5 M. La perméthylation produit une augmentation de l'incrément de masse entre les différentes espèces. Ainsi, la différence de masse entre les oligosaccharides homoglucooses,  $(\text{glucose})_n$ , et les oligosaccharides alditols,  $(\text{glucose})_{n-1}$  - sorbitol, passe de 2 à 16 u. Les ions  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  681, 697 et 635 sont observés respectivement pour les trois familles du DP3,  $(\text{glucose})_n$ ,  $(\text{glucose})_{n-1}$  - sorbitol et  $(\text{glucose})_{n-1}$  - anhydroglucose. De plus, nous découvrons une quatrième famille dont l'espèce moléculaire  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  651 correspond au composé  $(\text{glucose})_2$ -anhydrosorbitol (Figure 23). Dans ce cas précis, les pics correspondant à la matrice se trouvent à  $m/z$  égal à  $(108n + 23)$ .

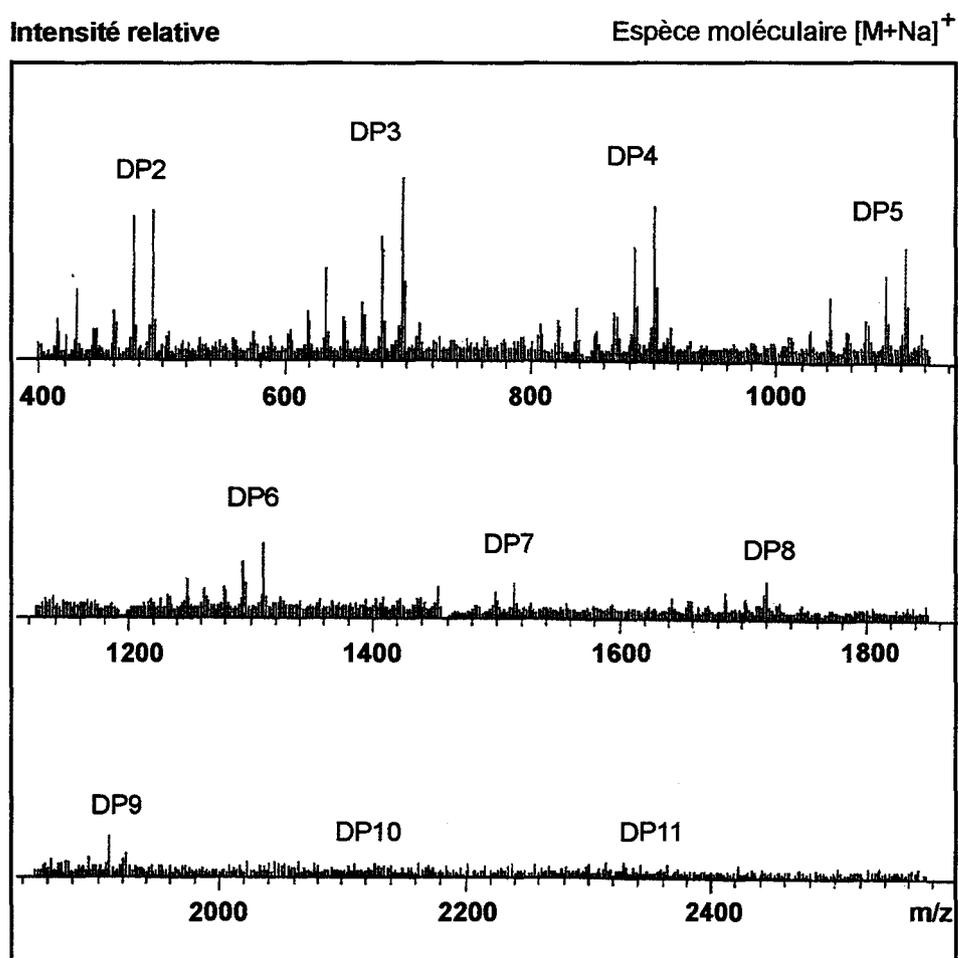
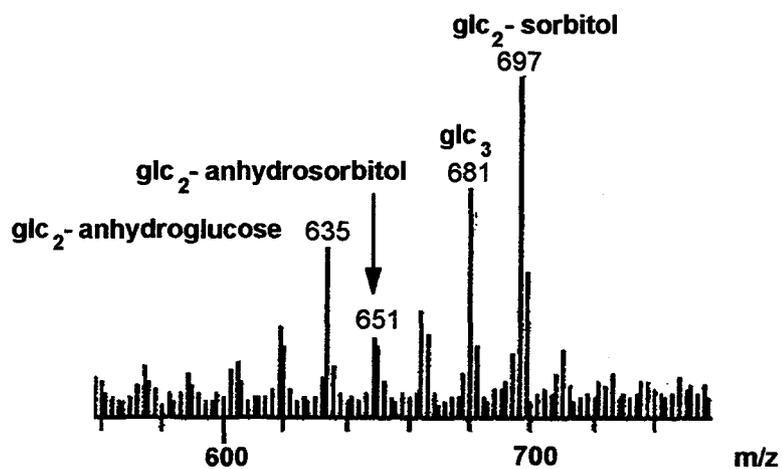


Figure 23: Spectre FAB en mode positif du polydextrose Pfizer A perméthylé

### 3. 3. 3. Conclusion

Les quelques rares exemples d'analyses quantitatives cités dans la littérature décrivent le cas de substances hydrophobes et des conditions d'analyses bien précises basées sur la détermination de la zone de linéarité, l'utilisation d'un standard interne et l'établissement d'une courbe de calibration. Mais, à la différence de nos polymères glucidiques, le produit à doser est unique (Tanaka, 1991; Laprévotte *et al.*, 1993). Les expériences préliminaires réalisées sur les maltooligosaccharides et sur le polydextrose Pfizer A montrent qu'une analyse quantitative de polymères glucidiques par FAB n'est pas applicable et cela pour une raison majeure. Lors de l'analyse du mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7, nous avons observé une décroissance de l'intensité relative en fonction de l'augmentation de la masse moléculaire de l'oligosaccharide prouvant l'existence du phénomène de suppression dans le cas d'une série homologue. Ce phénomène sera encore amplifié au moment de l'analyse de polymères glucidiques tels que les polydextroses composés de plusieurs familles d'oligosaccharides de nature chimique différente, car le phénomène de suppression décrit lors d'étude de peptides plus ou moins hydrophiles (Naylor *et al.*, 1986) résulte d'une compétition entre les espèces et mène à des spectres non représentatifs des produits.

Pour la suite de notre étude, nous nous sommes alors intéressés au comportement des polymères glucidiques par les deux autres processus de désorption douce: l'électrospray et le MALD.

### 3. 4. Analyses par électrospray

L'électrospray, développé par Fenn *et al.* à la fin des années 80, a été appliquée à l'analyse de nombreux polymères synthétiques dont des polyéthylèneglycol (PEG) (Wong *et al.*, 1988) même de très hautes masses moléculaires (Nohmi *et al.*, 1992). La détermination de leurs paramètres de distribution a été effectuée pour des PEG 1000 et 3150; les valeurs présentent une bonne corrélation avec celles obtenues par RMN et MALD. Pour des polymères de plus hautes masses, PEG 6000 par exemple, le calcul des masses moléculaires moyennes devient impossible à cause de la multiplicité des états de charges.

En l'état actuel de nos connaissances, il n'a pas été décrit de détermination de distribution par électrospray pour des polymères de nature saccharidique. La disponibilité de témoins, maltooligosaccharides de DP2 à 7, de structure proche des dextrans et des polydextrans nous ont permis d'envisager une nouvelle approche de l'analyse des polymères glucidiques par ES, et ensuite par MALD. En effet, il a été possible de simuler le comportement d'une dextrine en préparant un mélange équimolaire de maltooligosaccharides et d'observer son comportement en fonction des variations des conditions expérimentales étudiées. La caractérisation des polymères glucidiques de type maltodextrine a donc été envisagée après des analyses préliminaires des différents paramètres et caractéristiques de la spectrométrie de masse en mode électrospray sur ce mélange équimolaire de standards.

#### 3. 4. 1. Analyses du mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7

L'optimisation des conditions d'analyse par électrospray en mode positif a tout d'abord été réalisé sur un mélange équimolaire de maltooligosaccharides natifs de DP2 à 7. Les divers paramètres optimisés ont été la concentration en oligosaccharides, la concentration en sel, les paramètres de la source, cela dans le but d'obtenir un signal d'intensité quasi équivalente pour les 6 oligosaccharides présents en quantité équimolaire dans la gamme de masse correspondant à  $m/z$  200 à 1500. L'influence de la dérivation par perméthylation et de la réduction au  $KBD_4$  sur la réponse de ce mélange équimolaire ont ensuite été étudiées.

#### Oligosaccharides natifs

Le mode positif a été choisi d'emblée car il a été démontré que l'intensité de réponse en mode négatif est 10 fois inférieure à celle obtenue en mode positif. Une première analyse du mélange équimolaire de maltooligosaccharides des DP2 à 7 natifs a été réalisée dans le but de

déterminer les conditions de préparation des échantillons. En effet, le choix des solvants est déterminant pour la désorption des ions après l'électronébulisation. Les échantillons ont été solubilisés dans un mélange méthanol/eau (50/50 - v/v) et le spectre résultant présente les espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$  et des fragments difficilement interprétables. Les taux naturels de sodium et de potassium présents dans l'échantillon sont suffisants pour produire ces adduits. Or la multiplicité des espèces moléculaires est un désavantage important lors de la quantification de distribution de polymères plus complexes. Une de nos premières préoccupations a donc été d'obtenir un nombre d'ions limité par composé présent dans le produit. Pour se faire, dans une seconde expérience, l'échantillon a été dissous dans une solution méthanol/eau (50/50 - v/v) en présence d'acétate de sodium comme agent de cationisation. L'addition de sel de sodium augmente remarquablement l'intensité de l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$ .

La concentration en acétate de sodium initialement utilisée lors de nos premiers essais a été de 5 mM. Une telle concentration en sel se manifestait rapidement par une cristallisation du sel à l'entrée du capillaire et en un blocage du spray. La concentration en sel doit être un juste compromis entre une répartition des charges quantitatives et un bruit de fond pas trop important. Un rapport molaire oligosaccharide/sel compris entre 1/1 et 1/10 donne de bons résultats et la concentration finale en acétate de sodium a été fixée à 0,2 mM pour les analyses ultérieures, et ceci pour un débit de 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Dans ce cas, seule l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  est observée pour chaque oligosaccharide.

La concentration du mélange d'oligosaccharides a été progressivement diminuée par dilution afin de travailler dans une gamme de quantité par substance de l'ordre de la picomole injectée par analyse. L'intensité relative des composés du mélange reste constante et la détection des espèces moléculaires est possible jusqu'à un seuil de détection d'environ 1,2 pmole/ $\mu\text{l}$  (0,1 pmole/ $\mu\text{l}$  par composé), limite inférieure où le bruit de fond devient trop important pour une intégration des surfaces de pics en vue d'une analyse quantitative. Une quantité par espèce de l'ordre de 10 pmoles pour les analyses suivantes a été fixée en vue d'une quantification des polymères glucidiques.

Nous avons vérifié que les analyses ont été réalisées dans la zone de linéarité, c'est-à-dire que l'intensité relative est directement proportionnelle à la concentration en oligosaccharides. Cette condition est nécessaire pour toute approche quantitative. Le temps de balayage de la gamme de masse 200 à 1500 a été de 10 secondes par scan afin d'obtenir des spectres ayant

un rapport signal/bruit correct et donc une bonne sensibilité de détection des ions en vue d'analyses quantitatives fiables.

Après constatation que l'intensité des pics en ES est fortement dépendante des paramètres de la source, une optimisation de ces derniers a été réalisée dans le but d'obtenir une réponse équivalente pour les différentes espèces du mélange équimolaire. Les conditions d'ES déterminées pour une réponse quasi identique des maltooligosaccharides de DP2 à 7 équimolaires natifs dans une gamme de masse  $m/z$  200 à 1500 sont les suivantes: tension d'accélération de 5 kVolts et de 0,1 Volt à l'octapôle; température du capillaire, 200°C; quantité d'oligosaccharide injectée par espèce, 10 pmoles; concentration en acétate de sodium, 0,2 mM.

Le spectre de la Figure 24 représente le mélange équimolaire contenant la  $\beta$ -CD dans les conditions optimisées. Les ions observés sont  $m/z$  à 365, 527, 689, 851, 1013 et 1176 et correspondent respectivement à l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  des oligosaccharides de DP2, 3, 4, 5, 6 et 7 natifs. L'ion de l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  correspondant à la  $\beta$ -CD est observée à  $m/z$  1157. Les espèces dichargées  $[M+2Na]^{2+}$ , représentées par les DP<sup>2</sup> sur le spectre, ne sont très faiblement représentées. Les intensités de pics des espèces en quantité équimolaire sont du même ordre de grandeur même si elles ne sont pas rigoureusement identiques et cela pour plusieurs raisons que l'on peut qualifier de raisons extrinsèques. Les maltooligosaccharides ne possèdent pas tous le même degré de pureté, certains oligosaccharides étant contaminés par un DP supérieur et/ou inférieur. La préparation du mélange équimolaire est aussi source d'erreurs en raison du degré d'hydratation différent des maltooligosaccharides des prises d'essais.

Dans le but d'une analyse quantitative ultérieure des polymères glucidiques, plusieurs paramètres doivent être critiqués dont la méthode d'intégration des surfaces de pics, la reproductibilité des résultats et l'inertie du standard interne vis-à-vis des échantillons. Pour l'intégration des surfaces de pics, le système de traitement des données propose une conversion des spectres du mode "profile" en mode "centroïde", c'est-à-dire une transformation de la surface du pic en un bâton d'intensité correspondante. Toutefois, le logiciel de l'ordinateur intègre de façon variable les pics en fonction de la résolution, notamment en ce qui concerne les pics dus à l'isotopes 13 du carbone. Les conditions expérimentales, comme la résolution des espèces dichargées ou la présence du bruit de fond ne permettent pas une intégration en routine des surfaces de pics en électrospray. Aussi, en première approximation, nous préférons la quantification sur la base de la hauteur des pics en

Intensité relative

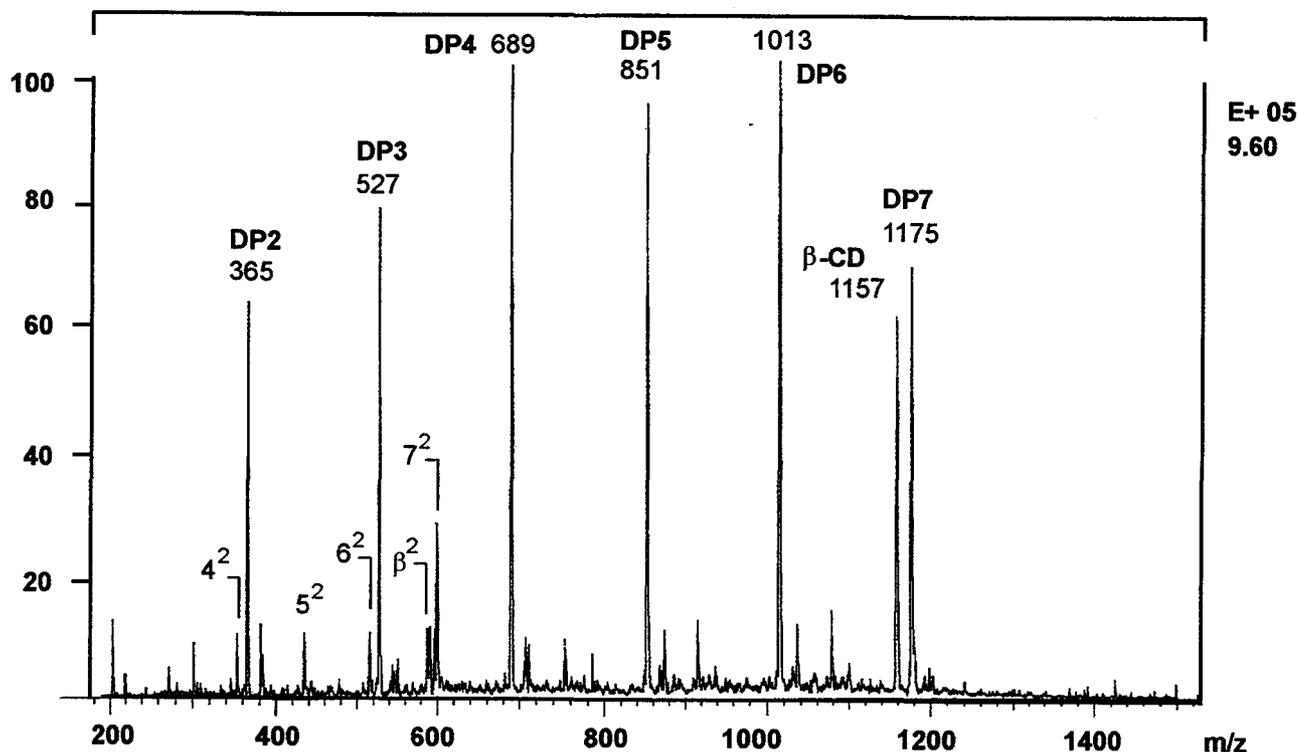


Figure 24: Spectre ES du mélange équimolaire natif de DP2 à 7

Tableau 5: Evaluation de la reproductibilité des intensités relatives des ions  $[M+Na]^+$  du mélange équimolaire de maltoligosaccharides de DP2 à 7 natifs contenant la  $\beta$ -cyclodextrine comme standard interne

Rapport des Intensités Relatives DP / $\beta$ -CD					
DP (m/z)	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>nd</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne	Ecart type
DP 2 (365)	1,03	0,86	0,79	0,89	0,12
DP 3 (527)	1,26	1,20	1,01	1,15	0,13
DP 4 (689)	1,65	1,53	1,44	1,54	0,10
DP 5 (851)	1,54	1,57	1,38	1,49	0,10
DP 6 (1013)	1,66	2,02	1,65	1,77	0,21
DP 7 (1175)	1,12	1,00	0,98	1,03	0,08

mode profile plutôt que l'intégration. La reproductibilité des résultats a été évaluée par mesure du rapport des intensités relatives DP/ $\beta$ -CD de trois acquisitions différentes réalisées dans des conditions expérimentales identiques. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5 et présentent des écarts types de faible valeur démontrant une reproductibilité satisfaisante des mesures effectuées dans les conditions préalablement définies.

L'influence de l'addition du standard interne dans l'échantillon sur les intensités relatives des maltooligosaccharides a été étudiée par comparaison du rapport de deux maltooligosaccharides DP3 et DP7 lors de deux manipulations différentes et ceci en présence et en absence du standard interne. Le Tableau 6 montre que le rapport DP3/DP7 est constant et que le standard interne n'influence aucunement le rapport des intensités relatives des espèces en solution. Cette comparaison démontre bien l'inertie du standard interne choisi et confirme que la  $\beta$ -CD peut être utilisée comme standard interne lors des caractérisations de polymères glucidiques.

Tableau 6: Comparaison du rapport des intensités relatives DP3 / DP7 natifs en présence et en absence du standard interne ( $\beta$ -CD)

	<b>Rapport des Intensités Relatives DP3 / DP7</b>	
	<b>en présence de <math>\beta</math>-CD</b>	<b>en absence de <math>\beta</math>-CD</b>
<b>1<sup>er</sup> essai</b>	1,12	1,10
<b>2<sup>nd</sup> essai</b>	1,20	1,14
<b>3<sup>ème</sup> essai</b>	1,03	1,09
<b>Moyenne</b>	1,12	1,11
<b>Ecart type</b>	0,07	0,02

Dans les conditions précédemment définies et grâce au standard interne, il est maintenant possible de déterminer les grandeurs de masses moléculaires moyennes en nombre et en poids ainsi que le  $\overline{DP}$  et l'indice de polydispersité  $I$  de ce mélange natif afin de le comparer aux valeurs théoriques attendues (Tableau 11). Les valeurs théoriques sont celles obtenues par calcul sur un spectre idéal présentant une réponse identique pour tous les oligosaccharides. Dans le cas du mélange équimolaire contenant la  $\beta$ -CD native, nous voyons que les résultats expérimentaux et théoriques sont en totale adéquation.

## Oligosaccharides méthylés

Le mélange précédent perméthylé est analysé dans les mêmes conditions expérimentales que le mélange natif. La Figure 25 présente le spectre du mélange des maltooligosaccharides en quantité équimolaire, contenant la  $\beta$ -CD, perméthylé. Il apparaît un peu plus compliqué en raison de la présence plus importante que dans le cas des oligosaccharides natifs des espèces dichargées. Les espèces moléculaires observées sont donc  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . La distribution est décalée vers les hautes masses moléculaires en raison de la dérivation et le centroïde est légèrement modifié. En effet, l'intensité des multichargés augmente en fonction de la taille de l'oligosaccharide perméthylé car plusieurs sites sont susceptibles d'être cationisés. Les masses à  $m/z$  477, 681, 885, 1089, 1293 et 1497 correspondent respectivement à l'espèce  $[M+Na]^+$  du DP2, 3, 4, 5, 6 et 7 perméthylés. La  $\beta$ -CD présente l'ion  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  1451. Lors de cette première approche de mélange perméthylé, l'inertie du standard interne vis-à-vis des oligosaccharides perméthylés a été aussi vérifiée. Le Tableau 7 montre la reproductibilité excellente des mesures. Pour l'estimation des masses moléculaires moyennes, nous avons réalisé deux types de calculs, l'un tenant compte uniquement de l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  et l'autre tenant compte de la somme des espèces monochargées et dichargées. Dans le cas de la somme des intensités des deux espèces, nous obtenons des valeurs plus proches des valeurs théoriques attendues. La reproductibilité des résultats sur l'échantillon perméthylé et la prise en compte des deux espèces moléculaires permet alors d'estimer le  $\overline{Mn}$ , le  $\overline{Mp}$ , le  $\overline{DP}$  et l'indice de polydispersité  $I$  (Tableau 11). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur le mélange natif. Il est toutefois important de préciser qu'au moment des calculs nous attribuons arbitrairement un facteur de réponse identique pour les deux espèces  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ .

Intensité relative

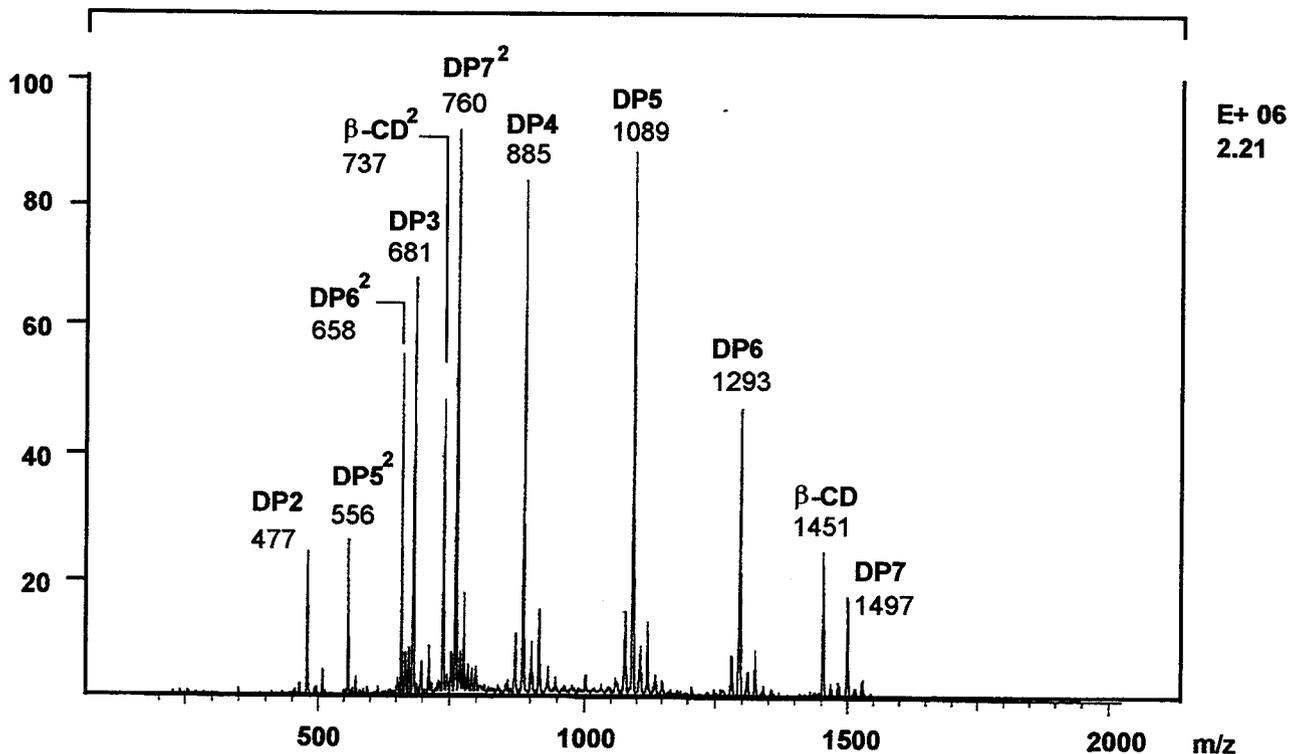


Figure 25: Spectre ES du mélange équimolaire de DP2 à 7 méthylé

Tableau 7: Evaluation de la reproductibilité des intensités relatives sur le mélange équimolaire de DP2 à 7 incluant le standard interne perméthylé

**Rapport des Intensités Relatives\***

**DP /  $\beta$ -CD**

DP (m/z)	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>nd</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne	Ecart type
DP 2 (477)	0,32	0,37	0,33	0,34	0,03
DP 3 (681)	0,95	0,99	1,04	0,99	0,04
DP 4 (885)	1,16	1,53	1,39	1,36	0,18
DP 5 (1089)	1,58	1,59	1,47	1,55	0,07
DP 6 (1293)	1,43	1,53	1,56	1,51	0,07
DP 7 (1497)	1,52	1,56	1,59	1,56	0,03

\* l'intensité relative d'un DP correspond à la somme des espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ .

## Oligosaccharides réduits

Une analyse préliminaire de glucose et de sorbitol en mélange équimolaire a montré une réponse très différente des deux monomères. En première approximation, ce résultat nous laissait penser que la réduction des oligosaccharides permettrait un gain de sensibilité appréciable car l'analyse montrait un coefficient de réponse du sorbitol environ 4 à 5 fois supérieur à celui du glucose. De ce fait, la réaction de réduction au  $\text{KBD}_4$  a été envisagée sur le mélange équimolaire de DP2 à 7 contenant la  $\beta$ -cyclodextrine. Les espèces moléculaires  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  368, 530, 692, 854, 1016 et 1178 correspondent aux oligosaccharides alditols monodeutérés de DP2, 3, 4, 5, 6 et 7. La cyclodextrine non réductrice n'est pas affectée par la réduction et montre l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  1157. Le spectre présente un bruit de fond plus important (Figure 26) que le spectre correspondant aux espèces natives, du à la présence résiduelle des borates. Par infusion, il semble donc plus difficile d'analyser des oligosaccharides réduits que des oligosaccharides natifs. L'électrospray est en effet une technique très sensible à la présence de sels. Dans le cas de la réduction de molécules de bas poids moléculaire, la seule alternative est de réaliser un dessalage des échantillons par de nombreuses codistillations successives en présence d'acide acétique. Seul le couplage LC/ESMS permettrait de dessaler correctement les échantillons afin de les analyser. Toutefois les mesures effectuées par infusion sont suffisamment reproductibles pour être interprétées (Tableau 8, partie [a]).

Les rapports des intensités relatives des DP réduits (D)/standard interne ont été calculés pour les espèces présentes et comparés à ceux obtenus avec le mélange natif. Le rapport des deux valeurs ainsi obtenues permet de déterminer le coefficient de réponse relatif de l'oligosaccharide réduit par rapport à son homologue natif. Les essais ont montré que pour l'ensemble du mélange équimolaire, le gain de réponse de chaque oligosaccharide n'était pas celui attendu, de l'ordre de 4 à 5 fois supérieur à celui des oligosaccharides natifs comme l'annonçait l'essai préliminaire des monomères de glucose et de sorbitol. En effet, le Tableau 8, partie [b] montre clairement que la réponse des alditols décroît très rapidement en fonction de la taille de l'oligosaccharide, cela peut s'expliquer par la participation décroissante du motif sorbitol quand l'oligosaccharide passe de 2 à 7 résidus. Ces résultats ont été confirmés par une autre préparation de maltooligosaccharides DP4 et DP7 natifs et réduits au  $\text{KBD}_4$  en quantité équimolaire injectés dans les conditions optimales. Le spectre montre la présence des espèces moléculaires  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  des oligosaccharides natifs et réduits.

Intensité relative

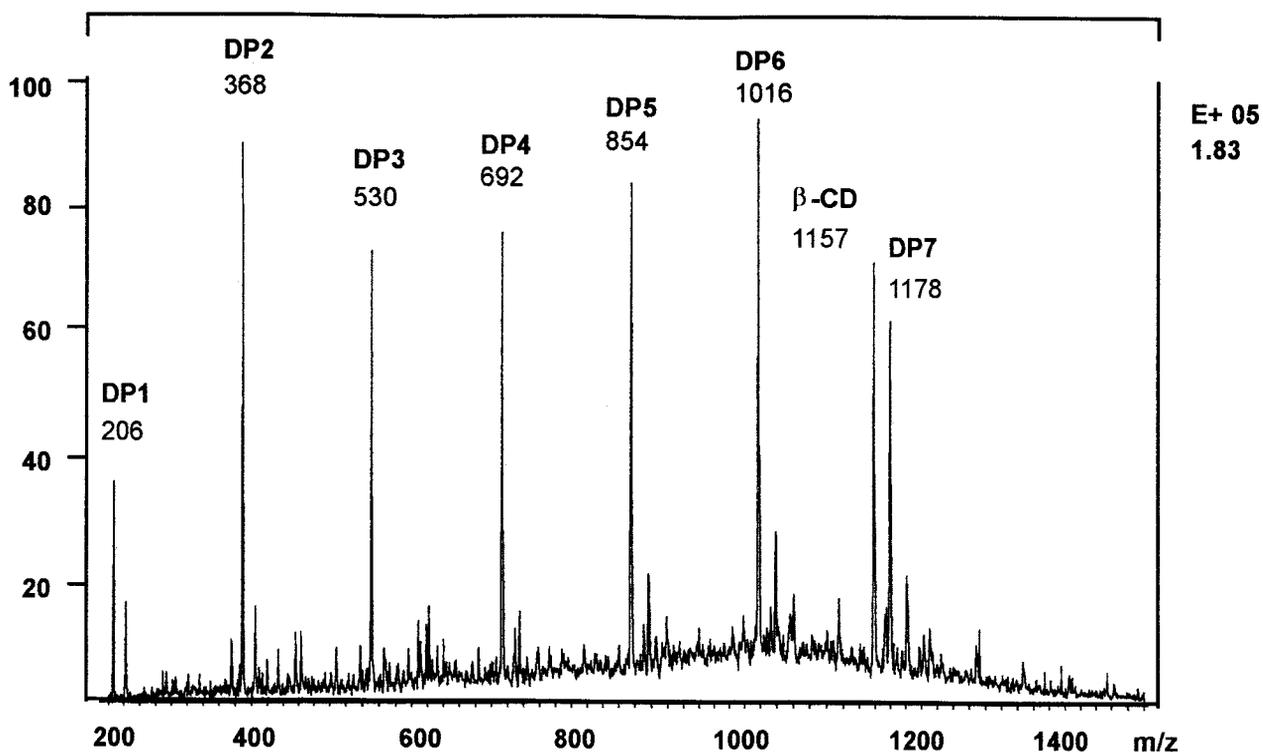


Figure 26: Spectre ES du mélange équimolaire de DP2 à 7 réduit (D)

Tableau 8: Evaluation de la reproductibilité des intensités relatives du mélange équimolaire de DP2 à 7 réduit (D) contenant la  $\beta$ -CD comme standard interne et détermination du coefficient de réponse relatif des maltooligosaccharides réduits par rapport à leur homologue natif.

DP	[a]					[b]	
	DP réduit (D) / $\beta$ -CD <sup>*a</sup>					DP / $\beta$ -CD <sup>*a</sup>	DP réduit / DP <sup>*b</sup>
	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>nd</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	moyenne 1	écart type	moyenne 2	coefficient de réponse relatif
1	0,57	0,63	0,54	0,58	0,04	0,18	3,22
2	1,64	1,16	1,31	1,37	0,24	0,89	1,54
3	1,00	1,13	1,08	1,07	0,06	1,15	0,93
4	1,12	1,38	1,10	1,20	0,16	1,54	0,78
5	1,18	1,16	1,21	1,18	0,02	1,49	0,79
6	1,31	1,06	1,32	1,23	0,15	1,77	0,69
7	0,80	0,79	0,86	0,82	0,04	1,03	0,79

\*<sup>a</sup> rapport des intensités relatives

\*<sup>b</sup> moyenne des intensités relatives 1 / moyenne des intensités relatives 2

Afin d'estimer les masses moléculaires moyennes du mélange équimolaire réduit, les calculs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ , de l'indice de polydispersité  $I$  et du  $\overline{DP}$  ont été réalisés de deux façons, d'une part en tenant compte du coefficient de réponse déterminé pour chaque oligosaccharide réduit par rapport à son homologue non réduit (Tableau 8, partie [b]) et d'autre part sans en tenir compte. Les valeurs sont présentées dans le Tableau 11 et les deux différents calculs démontrent que les valeurs corrigées sont plus proches des valeurs théoriques ce qui confirme que la quantification des oligosaccharides réduits doit être effectuée en tenant compte du coefficient de réponse de chaque oligosaccharide présent dans le mélange.

### Oligosaccharides réduits et méthylés

Les échantillons réduits, contenant la  $\beta$ -CD, analysés précédemment ont subis à une réaction de perméthylation. Les extractions chloroformiques qui suivent la réaction de méthylation permettent en même temps l'élimination de la soude en excès et des borates restant de la réaction de réduction. Le spectre présenté dans la Figure 27 exprime cette élimination des sels par une diminution importante du bruit de fond observé précédemment sur le spectre du mélange réduit. Comme dans le cas des oligosaccharides réducteurs perméthylés, les espèces moléculaires des maltooligosaccharides réduits perméthylés sont  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . Les ions  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  494, 698, 902, 1106, 1310 et 1514 correspondent aux maltooligosaccharides de DP2, 3, 4, 5, 6 et 7 monodeutérés et perméthylés. L'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  de la cyclodextrine perméthylée se présente à  $m/z$  1451.

Le Tableau 9 regroupe les valeurs des rapports des intensités relatives des oligosaccharides réduits méthylés / standard interne et montre de nouveau une reproductibilité acceptable des mesures.

Afin de déterminer l'influence de la réduction, le coefficient de réponse relatif de chaque maltooligosaccharide réduit et méthylé par rapport à son homologue méthylé a donc été déterminé (Tableau 10). Ces coefficients varient entre 1,13 et 1,40 et ne démontrent pas de différence en fonction de la masse de l'oligosaccharide.

Intensité relative

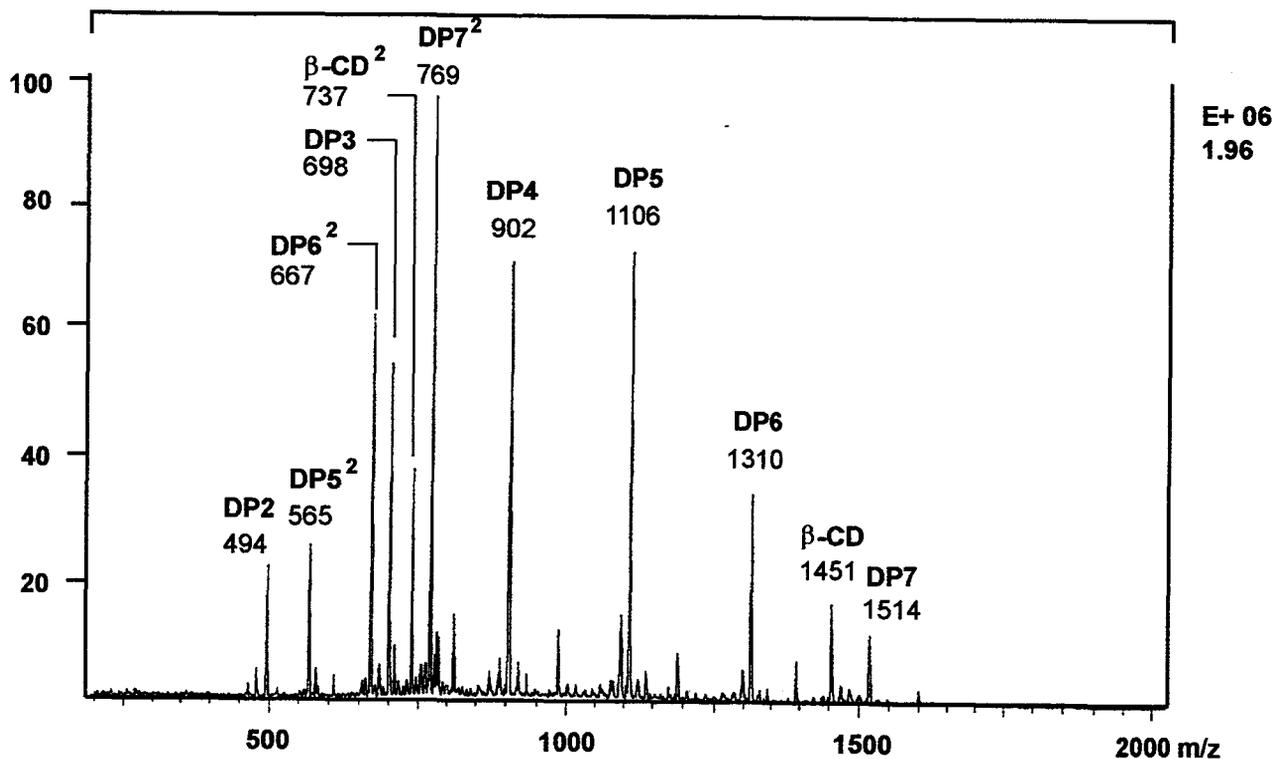


Figure 27: Spectre ES du mélange de DP2 à 7 équimolaire réduit (D) et méthylé

Tableau 9: Evaluation de la reproductibilité des intensité sur le mélange équimolaire de DP2 à 7 contenant la  $\beta$ -CD réduit (D) et perméthylé

**Rapport des Intensités Relatives\***

**DP /  $\beta$ -CD**

DP (m/z)	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>nd</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne	Ecart type
DP 2 (495)	0,4	0,49	0,48	0,46	0,05
DP 3 (699)	1,03	1,17	1,27	1,16	0,12
DP 4 (903)	1,37	1,68	1,57	1,54	0,16
DP 5 (1107)	1,85	1,96	1,86	1,89	0,06
DP 6 (1311)	1,75	2,08	2,12	1,98	0,20
DP 7 (1515)	2,05	2,48	2,19	2,24	0,22

\* l'intensité relative d'un DP est la somme des espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ .

Tableau 10: Détermination du coefficient de réponse relatif des maltooligosaccharides réduits et méthylés par rapport à leur homologue méthylé

<b>DP</b>	<b>DP réduit (D) / <math>\beta</math>-CD méthylé<sup>*a</sup></b> moyenne 1	<b>DP/ <math>\beta</math>-CD méthylé<sup>*a</sup></b> moyenne 2	<b>DP Réduit / DP<sup>*b</sup> méthylé</b> coefficient de réponse relatif
<b>DP2</b>	0,46	0,34	1,35
<b>DP3</b>	1,16	0,99	1,17
<b>DP4</b>	1,54	1,36	1,13
<b>DP5</b>	1,89	1,55	1,22
<b>DP6</b>	1,98	1,51	1,31
<b>DP7</b>	2,24	1,56	1,40

<sup>\*a</sup> rapport des intensités relatives: somme des intensités de l'espèce monochargée et dichargée du degré de polymérisation étudié (méthylé ou réduit, méthylé) / intensité de l'espèce monochargée du standard interne méthylé

<sup>\*b</sup> moyenne des intensités relatives 1/ moyenne des intensités relatives 2

Le Tableau 11 présente les valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ ,  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  obtenues avec l'échantillon de maltooligosaccharides de DP2 à 7 en quantité équimolaire contenant le standard interne réduit (D) et méthylé. De nouveau, les valeurs ont été calculées en tenant compte du coefficient de réponse déterminé précédemment ou sans en tenir compte. Les valeurs non corrigées et corrigées obtenues sont peu différentes mais comme dans le cas des oligosaccharides réduits les valeurs corrigées sont plus proches des valeurs théoriques.

Il est important de rappeler que les valeurs de  $\overline{Mn}$  et de  $\overline{Mp}$  de ce Tableau sont calculées en terme d'homoglucoses natifs (c'est-à-dire calculées avec les masses moléculaires des homoglucoses natifs) afin de pouvoir comparer directement les résultats.

Tableau 11: Comparaison des valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ ,  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  du mélange de maltooligosaccharides de DP2 à 7 équimolaire contenant la  $\beta$ -CD, natif, méthylé, réduit (D) et réduit (D) méthylé obtenues avec les valeurs théoriques. Les valeurs de paramètres des oligosaccharides réduits et des oligosaccharides réduits puis méthylés ont été aussi calculées en tenant compte du coefficient de réponse de chacun des oligosaccharides réduits par rapport à leur homologue non réduit, elles correspondent aux valeurs corrigées. Les valeurs de  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$  sont exprimées en équivalent homoglucoses natifs.

Mélange équimolaire DP2 à 7	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_p$	$\overline{DP}$	$I$
<b>Valeurs théoriques</b>	770	869	4,64	1,13
<b>Natif</b>	773	856	4,66	1,10
<b>Méthylé</b>	834	904	5,04	1,08
<b>Réduit (D)</b>				
<b>valeurs non corrigées</b>	722	824	4,34	1,14
<b>valeurs corrigées</b>	776	858	4,68	1,11
<b>Réduit (D) et méthylé</b>				
<b>valeurs non corrigées</b>	849	919	5,74	1,08
<b>valeurs corrigées</b>	836	904	5,04	1,08

En conclusion, nous pouvons dire que la série d'analyses par électrospray du mélange équimolaire de maltoligosaccharides de DP2 à 7 nous a permis de définir les conditions expérimentales d'analyse des oligosaccharides natifs afin d'obtenir une intensité de signal reproductible et quasi identique pour les composés en mélange.

Lors de l'analyse de l'échantillon natif, l'espèce moléculaire présente sur les spectres est uniquement de type  $[M+Na]^+$ . Les résultats des calculs de distribution glucidique sont peu différents et cohérents comparés aux valeurs théoriques attendues c'est-à-dire dans le cas de l'obtention d'une réponse réellement identique pour tous les composants.

Lorsque le mélange est perméthylé, les spectres montrent la présence de l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  prédominante mais aussi l'espèce moléculaire dichargée  $[M+2Na]^{2+}$ . L'expérience montre que le calcul des paramètres doit faire intervenir la somme des espèces mono et dichargées pour être en accord avec les valeurs théoriques. En première approximation, nous avons attribué un coefficient de réponse identique pour les deux espèces.

La réduction du mélange équimolaire nous a permis de mettre en évidence un coefficient de réponse spécifique à chaque alditol. Chaque oligosaccharide réduit possède en effet un coefficient de réponse inversement proportionnel à sa taille. Les valeurs de  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$  ne tenant pas compte de ce paramètre sont inférieures aux valeurs théoriques alors que les valeurs corrigées par les coefficients de réponse sont en accord avec les valeurs attendues. D'autre part, les oligosaccharides réduits doivent être correctement dessalés afin de donner des spectres ayant un rapport signal/bruit acceptable pour une intégration correcte des surfaces de pics en vue de l'étude quantitative. L'électrospray étant une technique sensible aux sels, les spectres des produits réduits contenant des borates résiduels présentent un bruit de fond assez important rendant la mesure de la hauteur des pics plus délicate.

L'analyse du mélange réduit (D) puis méthylé conduit à des spectres dont les valeurs de paramètres corrigées par les coefficients de réponse sont les plus proches des valeurs théoriques attendues mais toujours légèrement sur-estimées. La réduction en alditol du mélange ne permet donc pas d'apporter un gain de sensibilité comme l'annonçait la différence de coefficient de réponse entre les monomères de sorbitol et de glucose. La perméthylation des échantillons réduits permet une diminution notable du bruit de fond nous permettant d'obtenir des valeurs caractéristiques de l'échantillon du même ordre de grandeur que l'échantillon natif ou méthylé.

Comme la réaction de réduction n'apporte pas un gain de sensibilité plus important que la seule réaction de méthylation, l'étude des maltodextrines se limitera donc à l'analyse des répartitions glucidiques des produits natifs et perméthylés.

Il est important de souligner que nous avons démontré que les maltooligosaccharides réduits possèdent un coefficient de réponse apparemment dépendant de la longueur de la chaîne saccharidique et ceci dans les conditions expérimentales définies précédemment. Aussi pour une quantification des polydextroses, il ne faudra tenir compte que des constituants homoglucooses. En effet, il faudrait déterminer le coefficient de réponse de chaque constituant du polymère glucidique pour une quantification rigoureuse.

### 3. 4. 2. Analyses de maltodextrines

Les maltodextrines sont des polymères glucidiques qui présentent une gamme de masse plus étendue que le mélange équimolaire précédemment étudié. Etant donné la vaste gamme de maltodextrines, notre choix s'est porté sur trois produits, les Glucidex 12, 19 et 33, de distribution proche de celle des polymères glucidiques de type polydextrose dont nous aborderons l'étude dans les chapitres suivants. Le dextrose équivalent (DE) exprimé par les nombres 12, 19 et 33 représente un taux d'hydrolyse croissant de l'amidon.

La caractérisation par électrospray des maltodextrines natives et méthylées a été réalisée dans les conditions optimisées précédemment définies. La concentration en oligosaccharides est de l'ordre 500 pmoles/ $\mu$ l. Celle-ci a été calculée d'une part en se basant sur la quantité par espèce déterminée lors de l'analyse des oligosaccharides (soit 10 pmoles par espèce) et d'autre part sur l'étendue de la distribution de masse de l'échantillon déterminée par filtration sur gel. Les spectres des maltodextrines sont obtenus par infusion d'environ 5 nmoles d'échantillon à un débit de 3  $\mu$ l/min. Les échantillons sont dissous dans un solvant méthanol/eau (50/50 - v/v) et la concentration en acétate de sodium est de 0,2 mM.

Une première analyse a été réalisée dans la gamme de masse du mélange de DP2 à 7 c'est-à-dire entre 200 et 1500. Les masses moléculaires des oligosaccharides constituant les maltodextrines étant supérieures à 1500, cette analyse a été comparée à l'étude réalisée jusqu'à la gamme de masse limite de l'analyseur soit 2500 dans des conditions optimisées. Une optimisation des conditions pour la gamme de masse 200 à 2500 a alors été réalisée manuellement sur les ions des plus hauts DP d'une maltodextrine faiblement hydrolysée. Dans ces conditions, les paramètres précédemment fixés correspondent toujours à une réponse

quasi identique pour les oligosaccharides de DP2 à 7 et la tension à l'octapôle est fixée à 1,6 volts. La durée du balayage est de 18 secondes par scan afin de garder le même temps de balayage par masse  $m/z$  sélectionnée.

### Maltodextrines natives

La participation des espèces moléculaires présentes sur les spectres de Glucidex natifs est différente en fonction du degré d'hydrolyse de la maltodextrine. En effet, la proportion des espèces doublement chargées  $[M+2Na]^{2+}$  augmente quand le degré d'hydrolyse de la dextrine diminue. La présence des doublement chargés est donc directement liée à la taille des oligosaccharides constitutifs de la maltodextrine. Cette particularité de l'électrospray permet de déterminer des masses moléculaires dépassant la limite de masse de l'analyseur, soit 2500. La Figure 28 présente pour exemple le spectre obtenu avec le Glucidex 12. L'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  365, 527, 689 correspond respectivement au DP2, 3 et 4. Un incrément de masse de 162 Da permet de déterminer les degrés de polymérisation supérieurs.

### Maltodextrines perméthylées

La maltodextrine Glucidex 12 perméthylée présente la même double distribution des espèces moléculaires monochargées  $[M+Na]^+$  et dichargées  $[M+2Na]^{2+}$  (Figure 29). Les espèces moléculaires monochargées à  $m/z$  477, 681 et 885 correspondent respectivement aux DP2, 3 et 4 perméthylés. Dans ce cas, l'incrément de masse entre deux degrés de polymérisation successifs est de 204 Da.

Lors de l'étude des oligosaccharides, nous avons observé l'augmentation de l'apparition des ions multichargés lorsque la taille des oligosaccharides augmente. Ce phénomène est aussi remarqué lors de l'analyse des oligosaccharides perméthylés. Aussi au cours des analyses de maltodextrines (constituées de masses moléculaires supérieures au DP7) nous attendons une influence importante des ions dichargés.

Le Tableau 12 regroupe les calculs de  $\overline{Mn}$ , de  $\overline{Mp}$ , de  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  des maltodextrines natives et perméthylées dans la gamme de masse  $m/z$  200 à 2500 en tenant compte des ions monochargés ou des deux espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . Ces résultats permettent ainsi l'étude de l'influence des multichargés lors de l'analyse de maltodextrines de degrés d'hydrolyse différents.

Intensité relative

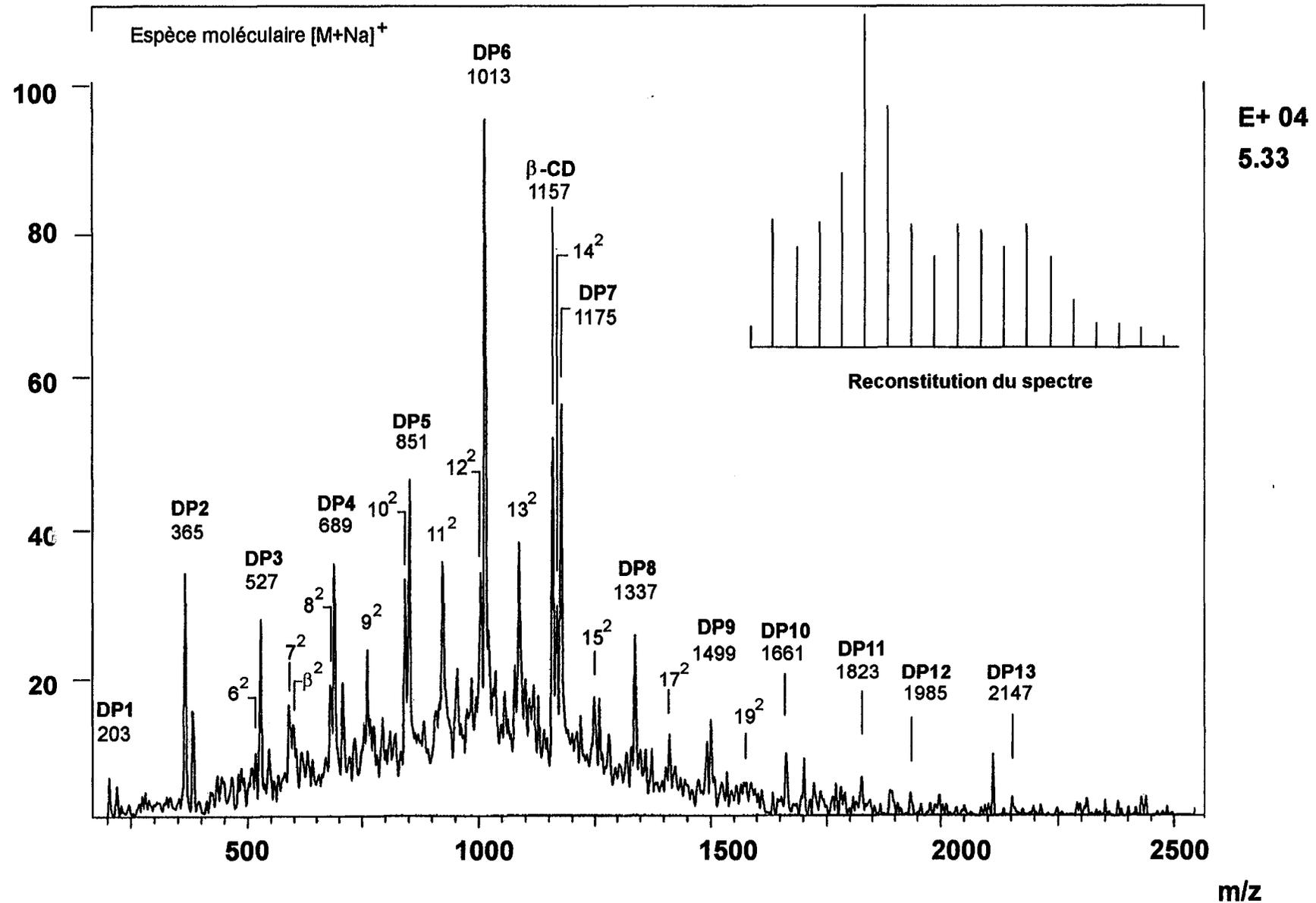


Figure 28: Spectre ES de la maltodextrine Glucidex 12 native

Intensité relative

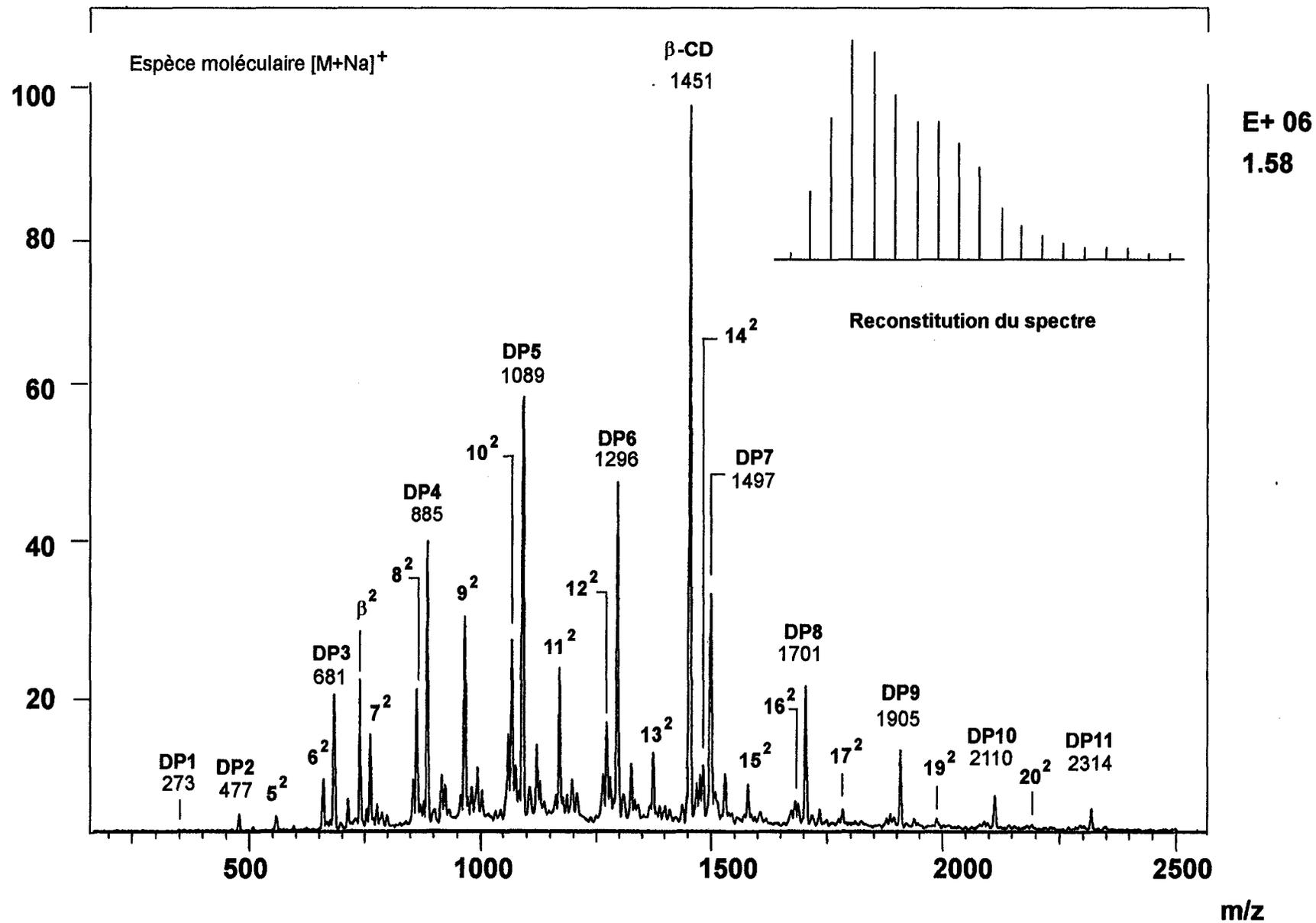


Figure 29: Spectre ES de la maltodextrine Glucidex 12 perméthylée

Tableau 12: Comparaison des valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ , de  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  pour les maltodextrines Glucidex 33, 19 et 12 natives et perméthylées. Les calculs ont été effectués uniquement sur la base des espèces monochargées ou en réalisant le calcul avec la somme des espèces mono et dichargées. Les valeurs sont exprimées en équivalent homogluucose.

Maltodextrines		$\overline{Mn}$	$\overline{Mp}$	$\overline{DP}$	$I$
espèce moléculaire					
<b>Glucidex 33</b>					
<b>natif</b>	$[M+Na]^+$	894	976	5,40	1,09
<b>natif</b>	$[M+Na]^+$ et $[M+2Na]^{2+}$	1146	1415	6,96	1,23
<b>méthylé</b>	$[M+Na]^+$ et $[M+2Na]^{2+}$	753	892	4,54	1,18
<b>Glucidex 19</b>					
<b>natif</b>	$[M+Na]^+$	949	1048	5,74	1,10
<b>natif</b>	$[M+Na]^+$ et $[M+2Na]^{2+}$	969	1069	5,87	1,10
<b>méthylé</b>	$[M+Na]^+$ et $[M+2Na]^{2+}$	1103	1251	6,70	1,13
<b>Glucidex 12</b>					
<b>natif</b>	$[M+Na]^+$	929	1069	5,62	1,15
<b>natif</b>	$[M+Na]^+$ et $[M+2Na]^{2+}$	1275	1557	7,76	1,22
<b>méthylé</b>	$[M+Na]^+$ et $[M+2Na]^{2+}$	1230	1435	7,48	1,17

Dans le cas du Glucidex 33, la maltodextrine la plus hydrolysée des trois produits étudiés, les masses moléculaires moyennes en masse et en poids ( $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$ ) calculées dans le cas du produit natif et impliquant l'espèce  $[M+Na]^+$  présentent une bonne corrélation avec celles déterminées sur le produit perméthylé en tenant compte des espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . L'intégration des espèces dichargées, faiblement représentées sur le spectre du produit natif, augmente de façon notable les valeurs et peut s'expliquer par une interférence importante du bruit de fond.

Les résultats obtenus avec le Glucidex 19 montrent une bonne corrélation dans les trois cas de figure. Pourtant, les valeurs calculées en effectuant la somme des deux espèces dans le cas du produit natif et méthylé sont les plus proches.

Les analyses du Glucidex 12, maltodextrine de degré d'hydrolyse le plus bas, montrent que les valeurs de masses moléculaires moyennes du produit natif et méthylé sont en accord

uniquement dans le cas où les calculs prennent en compte la somme des hauteurs de pics des deux espèces moléculaires. L'intégration des ions  $[M+Na]^+$  uniquement conduit à des masses moléculaires moyennes sous-estimées car elles ne prennent pas en compte des constituants de hautes masses moléculaires de la maltodextrine.

L'analyse des résultats obtenus avec les maltodextrines natives et méthylées permettent de conclure que dans le cas de maltodextrines méthylées, les résultats de masses moléculaires moyennes sont plus fiables dans le cas de l'intégration dans les calculs de la somme des hauteurs de pics des espèces mono et dichargées. Par contre dans le cas des maltodextrines natives, il semble qu'il faille intégrer dans les formules la somme des deux espèces moléculaires uniquement dans le cas où la hauteur de pic de l'espèce dichargée est supérieure à environ 10% de la hauteur du pic de l'espèce monochargée correspondante. Ces résultats sont exprimés en affectant aux deux espèces moléculaires un coefficient de réponse identique.

Pour résumer, nous avons montré que les résultats obtenus avec les maltodextrines natives et perméthylées présentent une bonne corrélation mais les espèces moléculaires à prendre en compte sont différentes en fonction de la masse moléculaire des oligosaccharides constitutifs du produit (c'est-à-dire en fonction du degré d'hydrolyse de la maltodextrine). En effet, plus la maltodextrine possède des hautes masses moléculaires plus l'influence de la présence des espèces dichargées est importante. Ceci est particulièrement bien représenté par les spectres des maltodextrines perméthylées. Dans ce cas, les calculs doivent donc être réalisés, comme nous l'avons vu précédemment lors de l'analyse du mélange équimolaire perméthylé, en réalisant la somme des espèces monochargées  $[M+Na]^+$  et dichargées  $[M+2Na]^{2+}$ . Pour les maltodextrines natives, nous avons observé que la présence des espèces dichargées augmente lorsque les oligosaccharides constitutifs du produit sont de masse moléculaire croissante. Pour une bonne compatibilité des résultats entre les valeurs sur maltodextrines natives et méthylées, la somme des espèces moléculaires mono et dichargées doit être intégrée dans le calcul des masses moléculaires moyennes lorsque la hauteur de pic de l'espèce dichargée représente approximativement 10% de la hauteur du pic de l'espèce monochargée. Lorsque l'espèce moléculaire monochargée est inférieure à ce seuil, la participation des espèces monochargées uniquement donne des résultats fiables.

### 3. 4. 3. Conclusion

L'électrospray est une technique qui permet l'analyse d'oligosaccharides natifs et méthylés avec une bonne sensibilité. Dans le cas particulier d'une maltodextrine composée d'oligosaccharides de DP1 à 20/25 (Glucidex 19), seulement 5 nanomoles du produit natif ont été nécessaires pour obtenir un spectre correct. Cependant l'ionisation des oligosaccharides est plus difficile que celle des peptides. Cette technique appliquée à l'étude des molécules glucidiques demande l'adjonction d'agent de cationisation. L'acétate de sodium a été choisi pour notre étude à une concentration de 0,2 mM.

La technique ES n'est pas connue à ce jour pour être une méthode de quantification. Cependant nous avons montré qu'une étude semi-quantitative relative des espèces composant des polymères glucidiques peut être obtenue dans certaines conditions préalablement définies. Ces différentes conditions sont déterminées comme étant: (1) la préparation de l'échantillon, en particulier la concentration en échantillon, l'addition de sels et l'introduction d'un standard interne (la  $\beta$ -CD), (2) l'optimisation des paramètres au niveau des tensions dans la source (température du capillaire, voltages, tension à l'octapôle), (3) la réalisation des mesures dans la zone de linéarité afin d'obtenir une intensité de pic proportionnelle à la quantité de produit, (4) l'obtention d'un rapport des intensités signal/bruit de fond supérieur à 5, (5) le calcul des paramètres de distribution des polymères par quantification sur la base de la hauteur des pics en mode profile plutôt qu'une intégration des surfaces de pic, (6) le rapport relatif oligosaccharide/standard interne des intensités de pics, (7) la prise en compte en fonction des cas des espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . A propos de ce dernier point, nous avons montré que pour une estimation des masses moléculaires moyennes des maltodextrines méthylées, il est impératif de réaliser la somme des hauteurs de pics des espèces mono et dichargées. De même dans le cas de maltodextrines natives, au delà d'une limite de participation de l'espèce dichargée de 10% en hauteur de pic par rapport à son espèce monochargée correspondante, les calculs sont réalisés avec la sommes des deux espèces. En deçà de cette limite, les espèces dichargées sont négligeables et les calculs ne faisant intervenir que les espèces monochargées sont cohérents. Dans ces conditions, les valeurs de paramètres glucidiques entre les maltodextrines natives et perméthylées sont en accord.

D'autre part, cette approche est qualifiée à juste titre d'étude semi-quantitative car elle présente des sources d'erreur dont il ne faut pas négliger l'importance au moment de l'interprétation des résultats dont: (1) la préparation des échantillons, (2) la méthode de quantification, (3) l'approximation des calculs de masses moléculaires moyennes due au

coefficient de réponse identique attribué arbitrairement aux espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ .

L'attribution d'un coefficient de réponse spécifique à chaque oligosaccharide a été mis en évidence lors de l'analyse des maltooligosaccharides alditols pour lequel le coefficient de réponse décroît très rapidement lorsque la masse du composé augmente. L'extrapolation de la technique d'étude semi-quantitative par ES/MS pour des polymères glucidiques de type polydextrose, présente une approximation supplémentaire car l'on considère dans ce cas que le coefficient de réponse d'un oligosaccharide est le même que celui de l'oligosaccharide de même DP d'une maltodextrine sans tenir compte entre autre de l'influence des différents types de liaisons osidiques.

La caractérisation de polymères glucidiques par ES que nous avons réalisée sera confrontée ultérieurement aux résultats obtenus par d'autres techniques dans le paragraphe présentant la discussion.

### 3. 5. Analyses par MALD

Nos travaux concernant la caractérisation de polymères glucidiques par MALD ont commencé en 1993 peu après la parution de l'article de Harvey décrivant les conditions d'analyses quantitatives d'oligosaccharides complexes. L'auteur a testé différentes matrices sur des oligosaccharides de type biantenné et présente des résultats préliminaires très intéressants. Il démontre en effet que l'acide 2,5 hydroxybenzoïque (DHB) permet d'obtenir une réponse quantitative sans introduction de standard interne jusqu'à 1000 picomoles d'oligosaccharide déposées sur la cible et dans ce cas la limite de détection est de l'ordre de 0,1 picomole. Le second point important est l'absence de fragmentation des oligosaccharides. Ces résultats préliminaires semblent compatibles avec une analyse quantitative d'oligosaccharides par la technique MALD. L'auteur fait pourtant mention de quelques restrictions. D'une part, l'intensité du signal correspondant à un nombre équivalent de moles d'oligosaccharides de type oligomannosidique  $(\text{Man})_5 \text{ à } 9 - \text{GlcNAc}_2$  diminue lorsque la masse moléculaire de l'oligosaccharide augmente et d'autre part, l'intensité d'une espèce diminue lorsque elle se retrouve en mélange avec d'autres oligosaccharides. Il semble donc important de garder en mémoire que des phénomènes de suppression restent possibles.

Parallèlement, depuis 1988, les analyses de polymères de polyéthylène glycol, de polystyrène, de poly(méthyl)métacrylate sont choses courantes. En 1992, Bahr *et al.* sont les premiers à établir une bonne corrélation entre les résultats obtenus par MALD et chromatographie de filtration sur gel pour des échantillons de poly(méthyl)métacrylate et de polyéthylène glycol à indices de polydispersité proches de 1,0.

Compte tenu des résultats des différents auteurs précédemment cités, l'étude quantitative des polymères glucidiques par MALD a commencé par la définition des conditions d'analyses sur le mélange témoin de maltooligosaccharides de DP2 à 7 puis par l'analyse des maltodextrines.

#### 3. 5. 1. Analyses du mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7

Le mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7 natif et méthylé permet en première approche de déterminer les conditions expérimentales et de définir les paramètres d'analyses par MALD afin d'obtenir une réponse quasi identique des intensités.

## Oligosaccharides natifs

La matrice DHB a été choisie pour nos analyses selon les critères de Harvey car elle donne une réponse quantitative dans une gamme de concentration relativement large qui se trouve être la zone de concentration de nos échantillons. La seconde particularité de cette matrice est de cristalliser en deux zones distinctes: une zone périphérique cristalline et une zone centrale dite amorphe ou vitreuse. Ce type de cristallisation est parfois appelé cristallisation différentielle. Les spots de dépôts étant visualisés sur écran, il nous est possible d'observer la cristallisation et de tester les différentes zones. Des essais de tirs laser nous ont montré que l'intensité de réponse est nettement plus intense dans la zone centrale amorphe. Le but de notre expérimentation n'étant pas la sensibilité puisque nous ne sommes pas limités en quantité de produits mais étant plutôt l'homogénéité, la représentativité des différents constituants des produits et donc la reproductibilité des analyses en vue d'une approche quantitative des polymères glucidiques, nous avons donc choisi pour les sucres hydrophiles natifs une cristallisation en zones différentielles grâce au DHB et des tirs au hasard dans la zone amorphe.

Le dépôt de l'échantillon sur la matrice fraîchement déposée sur la cible permet un mélange des molécules de matrice et d'échantillon permettant ainsi une plus grande homogénéité de la co-cristallisation, de la désorption et donc l'obtention de spectres de meilleure qualité.

La vitesse de cristallisation des spots contenant les molécules de matrice et d'échantillon glucidique s'est avérée être un paramètre important. Des essais à différentes vitesses de cristallisation, lente (séchage à température ambiante, 15-20 minutes), semi-rapide (courant d'air à température ambiante, 6-7 minutes) et rapide (courant d'air chaud, environ 2 minutes) ont montré que le séchage rapide permettait une co-cristallisation plus homogène des molécules de matrice et d'échantillon apportant une plus grande reproductibilité des analyses.

Certains auteurs préconisent une cristallisation préliminaire suivie d'une dissolution dans le méthanol ou l'acétone (Vorm *et al.*, 1994) et d'une seconde cristallisation afin d'augmenter l'intensité des signaux. Des essais ont été réalisés avec nos polymères glucidiques mais ils n'ont pas montré une réelle différence par rapport à la cristallisation unique.

D'autre part, la durée de l'acquisition a été fixée à l'accumulation de 50 tirs laser répartis manuellement et statistiquement sur toute la zone amorphe de la cible.

Lors de l'analyse du mélange de maltooligosaccharides de DP2 à 7, les espèces moléculaires sont classiquement  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$ . Comme dans le cas de l'électrospray

où l'acétate de sodium permettait la cationisation des espèces moléculaires, l'analyse quantitative de polymères glucidiques relativement hétérogènes par MALD est optimisée par adjonction d'un agent de cationisation dans la matrice, le P316 (1,4 naphthalène dipropionate de sodium de masse moléculaire 316). Un agent dopant est important car il permet de limiter le nombre d'espèces moléculaires par oligosaccharide. C'est d'autant plus intéressant que le nombre de constituant des polymères glucidiques augmente car il limite le nombre d'intégrations et les sources d'erreurs. La soude (NaOH) est souvent utilisée à cet effet mais elle ne nous a pas permis de cationiser efficacement les polydextroses. C'est pourquoi nous lui avons préférée le P316. Le spectre résultant du dopage au sodium de l'échantillon natif est présenté dans la Figure 30 où la seule espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  est observée à  $m/z$  365, 527, 689, 851, 1013 et 1175 correspondant respectivement au DP2 à 7. Le standard interne, la  $\beta$ -cyclodextrine, présente un ion  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  1157. Des essais ont été réalisés en mode linéaire et en mode réflectron. Comme le réflectron nous a permis d'obtenir une meilleure résolution nécessaire à la quantification des intensités de pics, nous avons choisi d'utiliser ce mode pour toutes nos analyses MALD. Cette condition nous permet de plus de vérifier la structure des polymères. La puissance du laser est le dernier paramètre étudié mais il n'est certainement pas le moins important. En effet, sur le mélange équimolaire de DP2 à 7 natif, nous avons observé qu'une puissance laser faible désorbe préférentiellement les DP de bas poids moléculaire alors qu'une puissance laser importante désorbe les DP de masses moléculaires supérieures. En 1996, Belu *et al.* ont montré l'influence de la variation de la puissance laser sur les valeurs de masses moléculaires moyennes de polymères synthétiques. Les auteurs concluent qu'une puissance laser légèrement supérieure à la puissance seuil, limite de désorption des ions, est la condition expérimentale qui mène à des valeurs en accord avec les valeurs issues d'analyses par chromatographie de filtration sur gel. Dans notre cas, cette condition se vérifie car une puissance laser égale à 50% de la puissance totale du laser (soit  $4,25 \text{ MW/cm}^2$ ), dans la zone amorphe, permet d'obtenir une réponse quasi identique pour les différents oligosaccharides en quantité équimolaire.

Trois essais ont été effectués afin d'évaluer la reproductibilité des résultats selon les critères définis antérieurement. Le Tableau 13 présente le rapport des intensités relatives du DP sur le standard interne. Les conditions expérimentales utilisées montrent la bonne reproductibilité des analyses.

Intensité relative

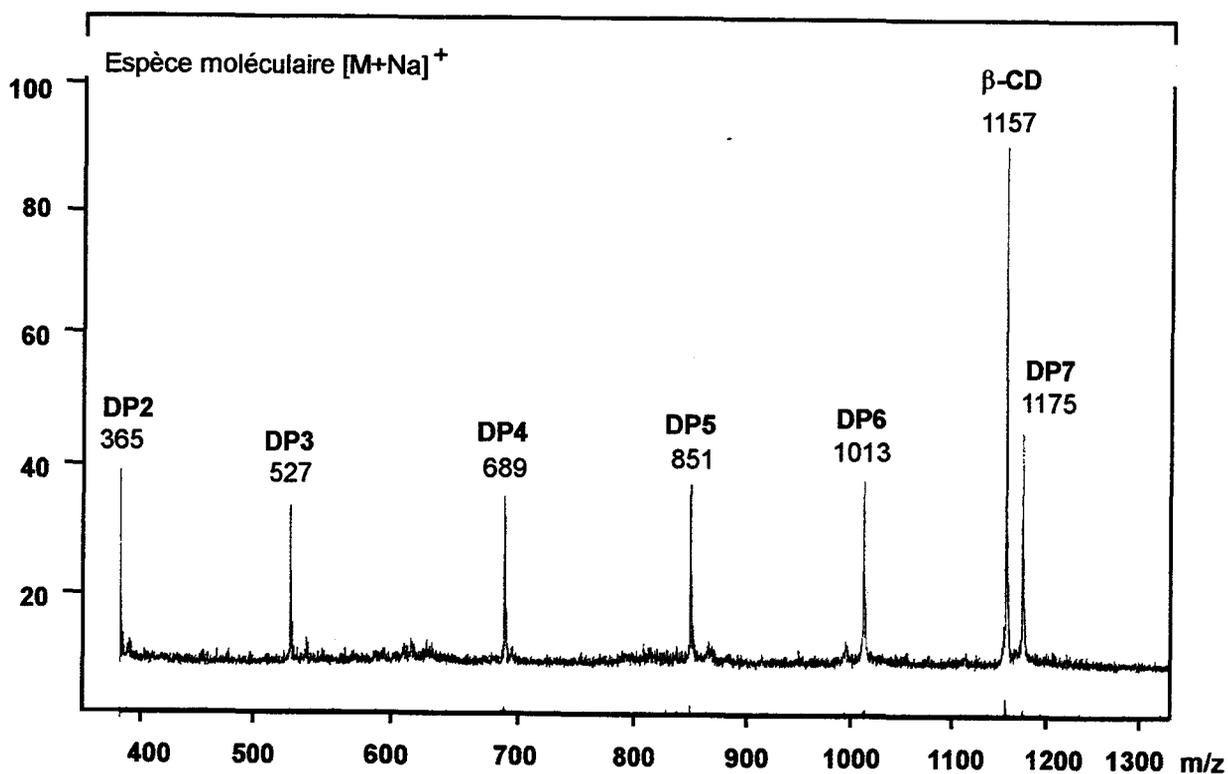


Figure 30: Spectre MALD du mélange équimolaire natif de DP2 à 7

Tableau 13: Evaluation de la reproductibilité des intensités relatives du mélange équimolaire de DP2 à 7 natif contenant la  $\beta$ -cyclodextrine comme standard interne (puissance laser à 50%, zone amorphe)

Rapport Intensités Relatives DP / $\beta$ -CD*					
DP	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>nd</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne	Ecart type
DP2	0,21	0,30	0,33	0,27	0,08
DP3	0,21	0,30	0,33	0,27	0,08
DP4	0,22	0,31	0,35	0,29	0,06
DP5	0,24	0,33	0,40	0,32	0,08
DP6	0,26	0,34	0,48	0,36	0,11
DP7	0,35	0,43	0,48	0,43	0,07

\* espèce moléculaire  $[M+Na]^+$

La constance des rapports DP3/DP7 en présence et en absence de standard interne a permis de nous assurer de l'inertie chimique de la  $\beta$ -cyclodextrine vis-à-vis des polymères glucidiques lors des analyses MALD.



### Oligosaccharides perméthylés

Les conditions précédentes (DHB, P316, cristallisation rapide, puissance laser à 50% de la puissance totale du laser) ont été appliquées lors de l'analyse du mélange contenant le standard interne après perméthylation. La cristallisation des molécules de matrice et d'oligosaccharides perméthylés est pourtant légèrement différente de celle des oligosaccharides natifs. En effet, la cristallisation en deux zones, amorphe et cristalline, est nettement moins évidente. Elle se présente de façon plus homogène. Cependant la désorption des molécules est de nouveau la plus importante dans la zone amorphe au centre de la cible.

Le spectre obtenu dans ces conditions présente les signaux à  $m/z$  477, 681, 885, 1089, 1293 et 1497 pour les DP2 à 7 perméthylés correspondant à l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$ . La  $\beta$ -cyclodextrine perméthylée présente un ion  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  1451 (Figure 31). La légère diminution d'intensité de réponse des DP2 et 3 perméthylés peut être attribuée à une perte d'une partie de ces produits par volatilisation dans la source. Ce phénomène est possible car les produits sont perméthylés. Le Tableau 14 présente les résultats obtenus pour trois essais et montre une bonne reproductibilité des analyses.

Les oligosaccharides perméthylés possèdent un coefficient de réponse bien supérieur à leur homologue natif mais étant donné la méthylation du standard interne qui lui attribue un facteur de réponse supérieur à la  $\beta$ -cyclodextrine native, les rapports des intensités relatives présentés dans le tableau ne permettent pas d'apprécier le gain de sensibilité dû à la méthylation.

Le Tableau 15 présente les valeurs identiques de paramètres de répartition glucidiques obtenues avec le mélange équimolaire natif et méthylé qui sont en accord avec les valeurs théoriques calculées.

Intensité relative

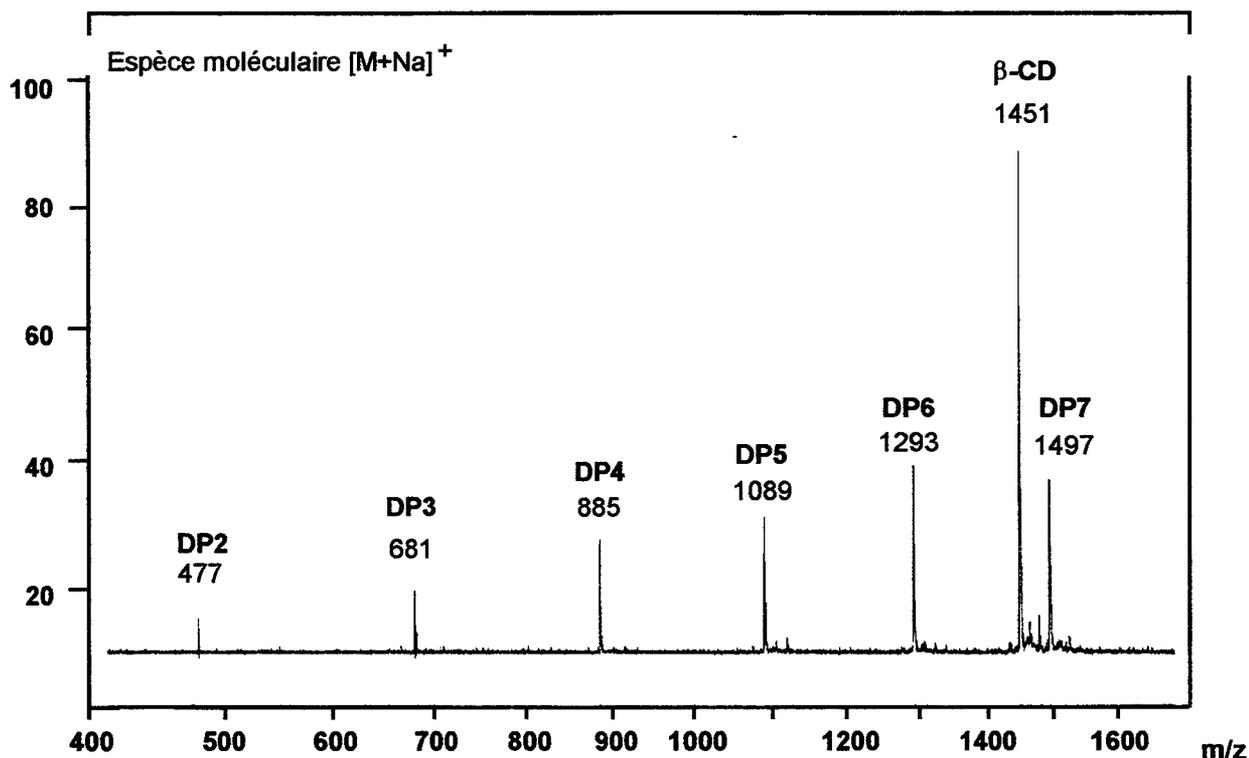


Figure 31: Spectre MALD du mélange équimolaire méthylé de DP2 à 7

Tableau 14: Evaluation de la reproductibilité des intensités relatives DP/standard interne du mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP 2 à 7 perméthylé (P316, zone amorphe, puissance laser 50%)

Rapport Intensités relatives DP / β-CD					
DP	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>nd</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne	Ecart type
DP 2	0,27	0,09	0,08	0,15	0,11
DP 3	0,58	0,20	0,12	0,30	0,24
DP 4	0,59	0,27	0,22	0,36	0,20
DP 5	0,52	0,26	0,26	0,35	0,15
DP 6	0,41	0,31	0,36	0,36	0,05
DP 7	0,33	0,33	0,34	0,33	0,01

Tableau 15: Comparaison des valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ ,  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  du mélange de maltooligosaccharides de DP2 à 7 équimolaire contenant la  $\beta$ -CD, natif et méthylé, obtenues avec les valeurs théoriques. Les valeurs de  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$  sont exprimées en terme d' homoglucooses natifs.

Mélange équimolaire DP2 à 7	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_p$	$\overline{DP}$	$I$
<b>Valeurs théoriques</b>	770	869	4,64	1,13
<b>Natif</b>	816	891	4,92	1,09
<b>Méthylé</b>	817	895	4,93	1,09

En conclusion, nous avons montré que les oligosaccharides natifs et méthylés peuvent être analysés dans les mêmes conditions expérimentales. La cristallisation est l'étape importante pour une bonne désorption des échantillons. Avec le DHB comme matrice, la cristallisation différentielle doit être rapide et la désorption des ions est obtenue par tirs laser au centre de la cible. Le dopage des échantillons au sodium (P316) génère uniquement l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$ .

### 3. 5. 2. Analyses de maltodextrines

#### Maltodextrines natives

Les maltodextrines, type Glucidex 12, 19 et 33 natives, présentent dans les conditions d'analyses précédentes un spectre montrant les espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  367, 529 et 691 correspondant respectivement aux oligosaccharides de DP2, 3 et 4 natifs. L'incrément de masse entre deux degrés de polymérisation successifs est égal à 162 Da et correspond à un motif glucose supplémentaire. La Figure 32 présente l'exemple de la maltodextrine Glucidex 12.

#### Maltodextrines perméthylées

De la même façon, les Glucidex 33, 19 et 12 perméthylés produisent sur les spectres les espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  477, 681 et 885 correspondant aux oligosaccharides de DP2, 3 et 4 perméthylés. L'incrément de masse est dans ce cas égal à 204 Da. Un avantage de

la perméthylation est de décaler la masse moléculaire des espèces présentes dans les produits dans les plus hautes masses évitant ainsi la superposition des pics de produit et de matrice (le spectre du DHB présente des masses moléculaires jusqu'à environ 300) et d'augmenter la sensibilité. Le spectre de la Figure 33 présente l'exemple du Glucidex 12 perméthylé.

Les conditions expérimentales sont identiques pour toutes les analyses c'est-à-dire une cristallisation rapide sous air chaud de la matrice dopée au P316 et de l'échantillon, un nombre de tirs égal à 50 répartis statistiquement sur toute la zone amorphe de la cible, une puissance laser égale à 50% de la puissance totale du laser. La comparaison des spectres natifs et méthylés montre que l'analyse des produits perméthylés permet la détection de DP supérieurs. Pour le Glucidex 33, par exemple, le DP supérieur détecté sur le spectre du produit natif est le DP15 alors que sur le spectre du produit perméthylé le DP supérieur est le DP24. Concernant le calcul des masses moléculaires moyennes des maltodextrines méthylées, nous avons réalisé deux calculs, l'un prenant en compte l'ensemble des degrés de polymérisation détectés sur les spectres et un second ne faisant intervenir que les DP détectés dans la maltodextrine native correspondante.

Le Tableau 16 rassemble les différentes valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ ,  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  obtenues pour les trois maltodextrines natives et perméthylées.

L'ensemble du Tableau montre que les  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$  les plus faibles correspondent à un degré d'hydrolyse élevé de la maltodextrine. Lorsque l'on compare les résultats de masses moléculaires moyennes des produits natifs et perméthylés, on remarque les valeurs les plus élevées sont celles qui résultent de l'intégration sur les spectres de produits méthylés de toutes les espèces détectées. Elles sont même légèrement supérieures aux valeurs obtenues sur les produits natifs. En effet, sur les spectres natifs nous ne détectons pas les plus hautes masses des produits qui sont mis en évidence par le gain de sensibilité apporté par la réaction de perméthylation. Ce phénomène est particulièrement représenté lors de l'étude de la maltodextrine Glucidex 12, maltodextrine la moins hydrolysée et donc constituée d'oligosaccharides de degrés de polymérisation de plus haute masse, en faible quantité. La détection et la mesure de la hauteur des pics correspondant à ces composés très faiblement représentés sont possibles sur des spectres de masses obtenus par MALD car cette technique présente l'avantage de produire sur les spectre d'un bruit de fond très faible.

Intensité relative

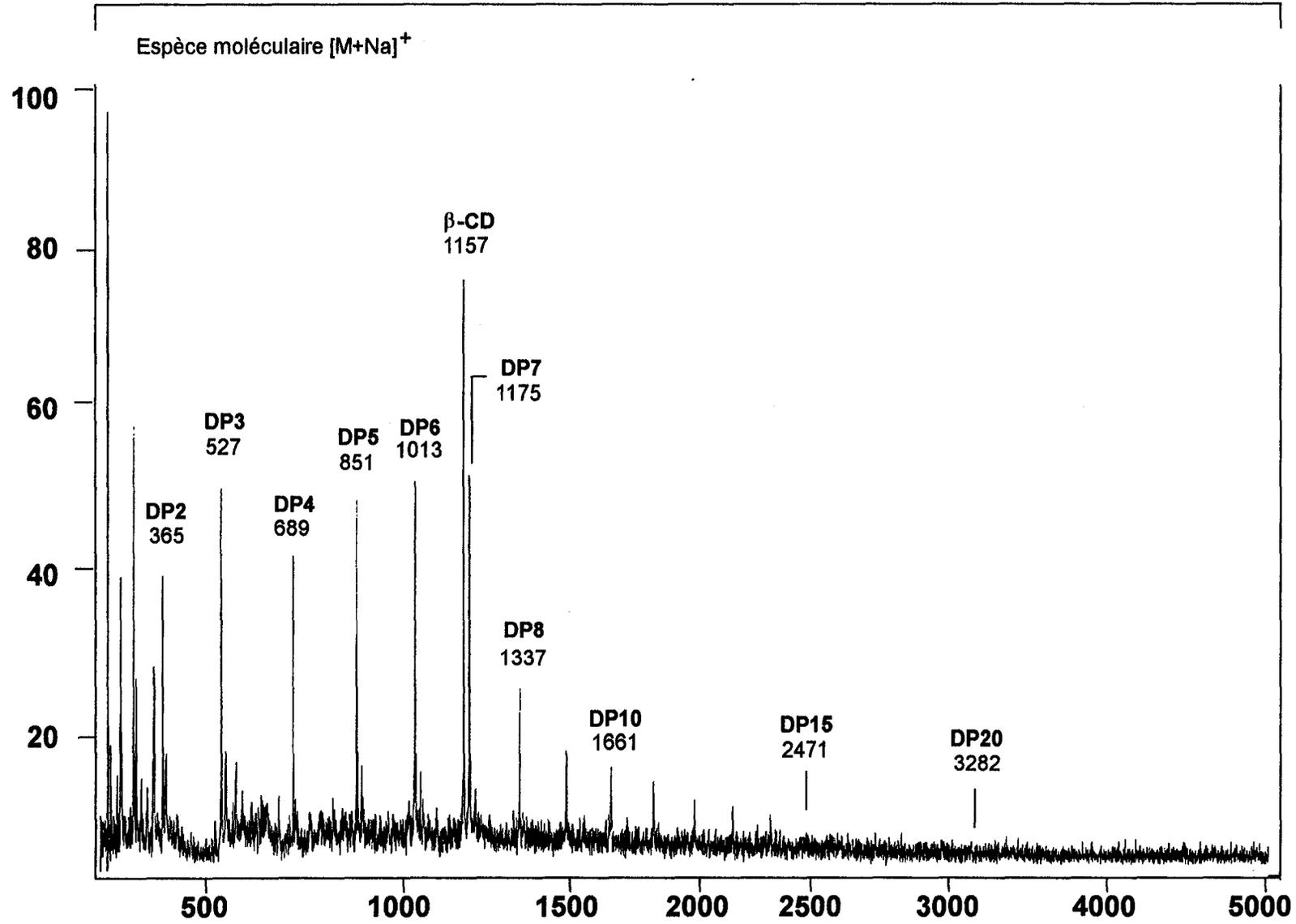


Figure 32: Spectre MALD de la maltodextrine Glucidex 12 native

m/z

Intensité relative

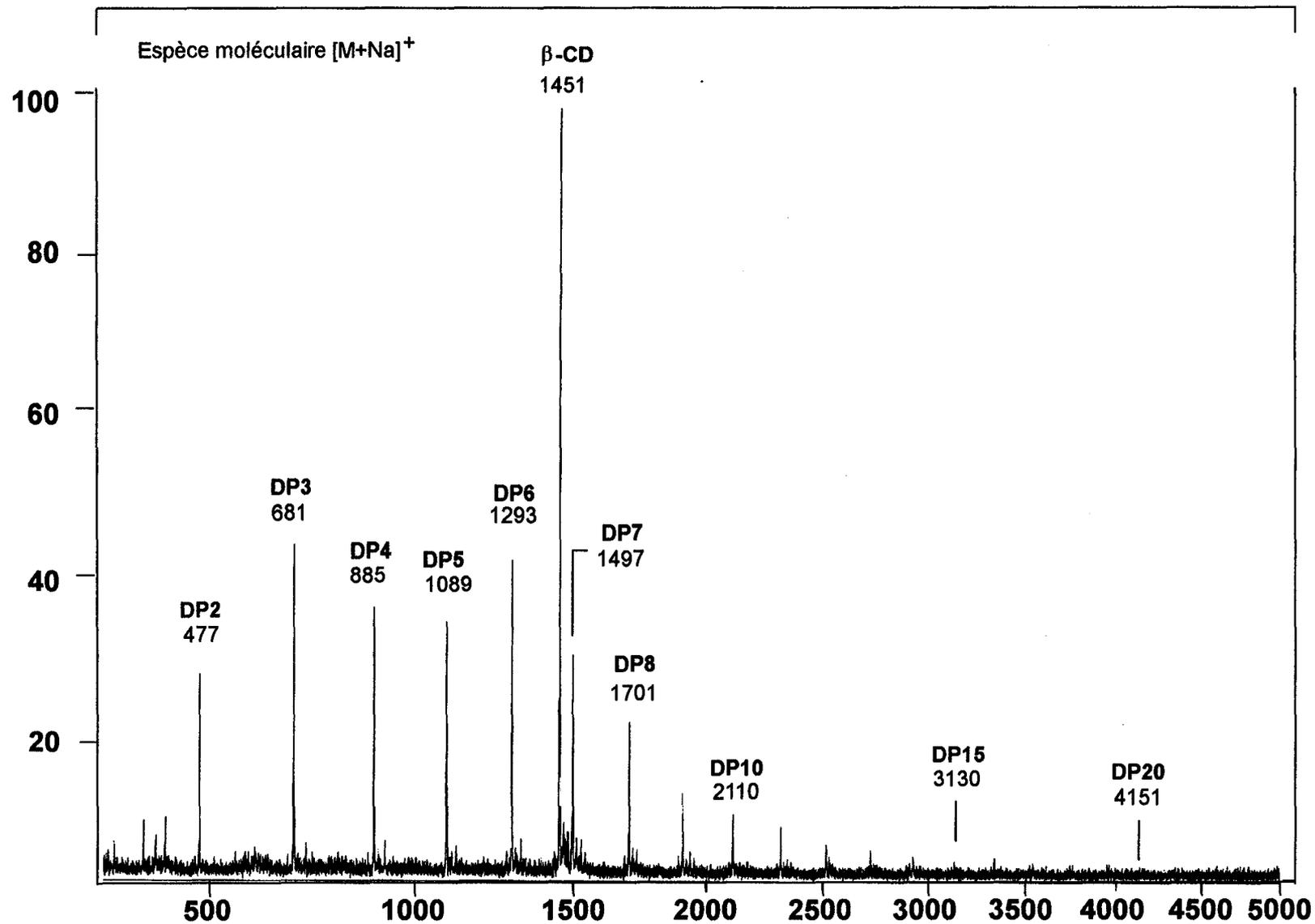


Figure 33: Spectre MALD de la maltodextrine Glucidex 12 perméthylée

m/z

Tableau 16: Comparaison des valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ ,  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  pour les maltodextrines Glucidex 33, 19 et 12 natives et perméthylées. Le DP supérieur détecté correspond au composé le plus haut en masse observé sur le spectre du produit natif ou méthylé. Le DP supérieur intégré dans le calcul des masses moléculaires moyennes du produit méthylé correspond au DP supérieur détecté sur le spectre du produit natif. Les valeurs moyennes sont exprimées en équivalent homogluucose.

<b>Maltodextrines</b>		$\overline{Mn}$	$\overline{Mp}$	$\overline{DP}$	$I$
espèce moléculaire $[M+Na]^+$					
<b>Glucidex 33</b>					
<b>natif</b>	DP supérieur détecté 15	862	1072	5,21	1,24
<b>méthylé</b>	DP supérieur intégré 15	725	1025	4,36	1,43
	DP supérieur détecté 24	786	1246	4,74	1,58
<b>Glucidex 19</b>					
<b>natif</b>	DP supérieur détecté 14	914	1116	5,53	1,22
<b>méthylé</b>	DP supérieur intégré 14	749	926	4,51	1,24
	DP supérieur détecté 18	824	1013	4,97	1,23
<b>Glucidex 12</b>					
<b>natif</b>	DP supérieur détecté 15	1050	1208	6,37	1,15
<b>méthylé</b>	DP supérieur intégré 15	956	1133	5,79	1,18
	DP supérieur détecté 25	1061	1376	6,40	1,30

Pour conclure, la caractérisation par MALD des maltodextrines Glucidex 33, 19 et 12 a donc été réalisée dans les conditions préalablement déterminées grâce aux maltooligosaccharides témoins de DP2 à 7. Alors que nous n'avions pas observé de différence entre les résultats de masses moléculaires moyennes du mélange équimolaire natif et perméthylé par rapport aux valeurs théoriques attendues, la conclusion se rapportant à l'analyse des maltodextrines par MALD est plus délicate. La méthylation des maltodextrines permet la détection de degré de polymérisation supérieurs non détectés lors de l'analyse des maltodextrines natives. D'autre part, la méthylation apporte une volatilité supérieure des

composés ce qui permet de suspecter une perte des composés de faible masse moléculaire, DP1, 2 et 3, dans la source, comme nous l'avons remarqué sur le mélange équimolaire de DP2 à 7. Il en résulte pourtant que les valeurs obtenues par intégration de la totalité des composés détectés sur les spectres MALD des produits méthylés sont les plus en accord avec les valeurs résultant des spectres de produits natifs.

### 3. 5. 3. Conclusion

L'analyse de maltooligosaccharides témoins et de maltodextrines nous a permis de définir un certain nombre de paramètres influençant la co-cristallisation matrice/échantillon et les phénomènes de désorption/ionisation pouvant affecter la réponse des analyses lors de la caractérisation de polymères glucidiques par MALD.

La préparation de l'échantillon comprenant le dépôt sur la cible de l'échantillon et la co-cristallisation matrice/échantillon est la partie primordiale d'une analyse MALD. En effet, ces étapes sont responsables de la variabilité, limitée lors du dépôt de l'échantillon par un mélange matrice/échantillon le plus homogène possible et lors de la cristallisation par un séchage rapide sous courant d'air chaud (environ 2 minutes). Pour la désorption-ionisation, la puissance laser a été fixée à 50% de la puissance totale, intensité qui donne une réponse quasi identique pour le mélange équimolaire de maltooligosaccharides. Ce paramètre est important car il faut éviter ou limiter la fragmentation.

D'autre part, comme il s'agit d'analyses réalisées dans un but quantitatif, il est important de tenir compte du choix de la matrice, du choix du standard interne, du nombre de tirs laser et de leur localisation sur la cible. Le dopage des dépôts au sodium, par l'intermédiaire du 1,4 naphthalène dipropionate de sodium ou P316, a permis l'obtention de la seule espèce moléculaire  $[M+Na]^+$ . Il n'a pas été observé avec nos produits d'espèces dichargées comme Garrozzo l'a montré lors de l'analyse de dextrans 50.000 et 80.000 Da, polymères de plus hautes masses moléculaires que les maltodextrines que nous avons analysées (Garrozzo, 1995).

Lorsque l'ensemble de ces critères sont respectés, nous avons montré que les analyses présentaient une bonne reproductibilité. La caractérisation des polymères glucidiques par MALD est alors possible mais il est important de connaître et de contrôler tous les paramètres qui entrent en jeu. En effet nombreux sont les paramètres qui vont interférer sur l'homogénéité de l'échantillon et donc sur la reproductibilité des analyses. Aussi par opposition au terme de quantification utilisé par certains auteurs nous lui préférons le terme

d'analyse semi-quantitative pour la caractérisation des polymères glucidiques par spectrométrie de masse en mode MALD.

L'étude préliminaire du mélange équimolaire de DP2 à 7 natif et méthylé qui nous a servi à optimiser les conditions expérimentales a permis l'obtention de valeurs de masses moléculaires moyennes calculées en parfait accord avec les valeurs théoriques attendues. Ces conditions appliquées aux maltodextrines ont montré une différence entre les valeurs des masses moléculaires moyennes effectuées à partir des spectres des maltodextrines natives et méthylées. En effet, la méthylation, en plus de décaler par l'augmentation de masse les composés du polymères des pics de matrices, apporte un gain de sensibilité permettant d'observer les DP de plus hautes masses moléculaires qui n'avaient pas été détectés sur le spectre du produit correspondant natif. D'autres part, la volatilité apportée par dérivation des oligosaccharides par perméthylation implique une sous-estimation dans les basses masses moléculaires et notamment des DP1, 2 et 3 perméthylés comme cela a été aussi observé sur le mélange équimolaire méthylé. Les résultats obtenus sur les spectres des produits perméthylés présentent une sous-estimation des basses masses moléculaires. Ces résultats seront confrontés à ceux obtenus par d'autres techniques dont l'électrospray dans la discussion présentée dans le prochain paragraphe.

### 3. 6. Discussion

L'étude systématique des paramètres de variabilité de la préparation des échantillons et des appareils de spectrométrie de masse par l'intermédiaire d'un mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7 nous a servis à déterminer des conditions expérimentales précises permettant de produire des spectres reproductibles et compatibles avec une analyse semi-quantitative par ES et MALD. Les valeurs de distributions obtenues avec ce mélange standard sont en accord avec les valeurs théoriques calculées sur la base d'un réponse identique de chaque oligosaccharide en mélange.

La caractérisation des polymères glucidiques par spectrométrie de masse et les valeurs de masses moléculaires moyennes calculées, selon des critères définis lors des études précédentes, peuvent alors être comparées avec les valeurs issues des techniques conventionnelles. Le Tableau 17 rassemble toutes les données que nous avons accumulées concernant les paramètres de distribution glucidique des maltodextrines Glucidex 33, 19 et

Tableau 17: Comparaison des paramètres de répartition glucidique des Glucidex 33, 19 et 12 (natifs et méthylés) obtenus par spectrométrie de masse, ES et MALD, par chromatographie de filtration sur gel (GPC), par RMN et par cryométrie.

		Glucidex 33		Glucidex 19		Glucidex 12	
		natif	méthylé	natif	méthylé	natif	méthylé
$\overline{Mn}$	<b>ES</b>	894	753	969	1103	1275	1230
	<b>MALD</b>	862	786	914	824	1050	1061
	<b>GPC</b>	600	-	1150	-	1710	-
$\overline{Mp}$	<b>ES</b>	976	892	1069	1252	1557	1435
	<b>MALD</b>	1072	1246	1116	1013	1208	1376
	<b>GPC</b>	1950	-	9000	-	16300	-
$\overline{DP}$	<b>ES</b>	5,40	4,54	5,87	6,70	7,76	7,48
	<b>MALD</b>	5,21	4,74	5,53	4,97	6,37	6,40
	<b>GPC</b>	3,7	-	7,1	-	10,5	-
	<b>RMN</b>	3,97	-	6,74	-	8,98	-
	<b>Cryom.</b>	3,65	-	7,23	-	10,18	-
$I$	<b>ES</b>	1,09	1,18	1,10	1,13	1,22	1,17
	<b>MALD</b>	1,24	1,58	1,22	1,23	1,15	1,30
	<b>CPG</b>	3,25	-	7,82	-	9,53	-

12, natives et perméthylées, selon différentes techniques dont la spectrométrie de masse, ES et MALD. Elles sont confrontées aux valeurs résultant de techniques telles que la chromatographie de filtration sur gel (GPC), la cryométrie et la résonance magnétique nucléaire.

Une observation globale de ce tableau montre une disparité des valeurs lorsque l'on compare la spectrométrie de masse aux autres techniques. Pourtant, toutes les techniques y compris la spectrométrie de masse décrivent une augmentation nette des valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$  et  $\overline{DP}$  observées lorsque le degré d'hydrolyse de la dextrine diminue, ceci exprimant une augmentation de la masse moléculaire des constituants des dextrines, du Glucidex 33 au Glucidex 12.

Parallèlement à notre étude, des auteurs ont montré que le paramètre important de la caractérisation d'un polymère est son indice de polydispersité ( $I$ ). En effet, des études menées sur des polymères synthétiques de type polyéthylèneglycol (PEG), polypropylèneglycol (PPG) et poly(méthyl)métacrylate (PMMA) ont montré, une bonne corrélation des résultats entre le MALD et la chromatographie de filtration sur gel lorsque cet indice est proche de 1,0 (Montaudo *et al.*, 1995c; Schweer *et al.*, 1996) et cela jusqu'à des masses très élevées de l'ordre de 430.000 Da (Danis *et al.*, 1995). De même, les valeurs obtenues par ES et par chromatographie de filtration sur gel sont en accord quand le polymère est monodispersé (Prokaï *et al.*, 1993). Quand l'indice de polydispersité est supérieur à environ 1,3, il est alors très difficile de corréler les résultats issus de ces deux techniques et les valeurs obtenues par MALD sont nettement inférieures à celles de la chromatographie de filtration sur gel. (Montaudo *et al.*, 1995a et b; McEwen *et al.*, 1996).

Des indices de polydispersité de 3,2, 7,8 et de 9,5, déterminés par chromatographie de gel filtration, respectivement pour le Glucidex 12, 19 et 33, montrent toute la difficulté à déterminer les paramètres de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$  et  $\overline{DP}$  pour ces polymères polydispersés par spectrométrie de masse.

Concernant le Glucidex 33, la maltodextrine la plus hydrolysée, les résultats de  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$  par spectrométrie de masse, ES et MALD, montrent une bonne corrélation mais les valeurs sont différentes de celles obtenues par chromatographie de filtration sur gel. Au sujet du  $\overline{Mn}$ , la spectrométrie de masse exprime une légère sur-estimation. Ce phénomène a déjà été observé par Montaudo *et al.* en 1994 et par Cottrell *et al.* en 1995 à propos de polymères de polymétacrylate monodispersés présentant une sur-estimation de 5 à 10% par MALD par rapport à la chromatographie de filtration sur gel pour des polymères de bas poids

moléculaires. Par contre, le  $\overline{Mp}$  est sous-estimé par spectrométrie de masse. En effet, la chromatographie de filtration détecte des masses moléculaires allant jusqu'à 33.000 Da pour ce produit alors que nous avons détecté des masses au maximum égales à 3.000 par spectrométrie de masse en mode MALD.

En 1995, Lehrle *et al.*, ont proposé deux hypothèses afin d'expliquer la sous-estimation des masses moyennes par MALD dont une possible dégradation des produits lors des analyses et la suppression des hautes masses moléculaires lorsque celles-ci se retrouvent dans un échantillon polydispersé. Nous excluons cette première hypothèse car il a été montré par Stahl *et al.*, en 1991, puis par Harvey en 1993, que l'analyse d'oligosaccharides dans les conditions expérimentales utilisées ne présentent pas de fragmentation et nous n'avons effectivement pas observé de fragmentation lors de l'analyse de nos oligosaccharides témoins. La seconde hypothèse qui réside en la suppression des hautes masses moléculaires d'un échantillon polydispersé a, d'autre part, été aussi avancée par Harvey en 1993 et par Montaudo *et al.*, en 1995c. Par ailleurs, Martin *et al.*, en 1996, ont analysés par MALD des échantillons artificiels largement dispersés issus de mélanges de polymères en quantité équimolaire de  $\overline{Mp}$  compris entre 5.500 et 98.100 peu dispersés. Les auteurs ont observé que pour désorber la fraction composée de hautes masses moléculaires la puissance laser nécessaire doit être supérieure à celle qui désorbe les plus basses masses. Or, une augmentation très importante de la puissance laser provoque une fragmentation des plus basses masses non souhaitable pour la quantification. D'autre part, quelque soit la puissance laser appliquée, la suppression des hautes masses moléculaires d'un échantillon dispersé est évidente et elle augmente avec la masse du polymère. Latourte *et al.*, en 1997, proposent comme explication à la discrimination des hautes masses, la difficulté de solubiliser les composantes de hautes masses moléculaires du polymère dans la matrice ce qui réduit leur rendement d'ionisation-désorption. D'autre part, Tang *et al.*, en 1995, ont montré que la conversion ion/électron réalisée par la dynode de conversion est moins efficace pour les hautes masses moléculaires. L'augmentation du voltage de post-accélération de la dynode de conversion de 3 à 12 kV permet d'augmenter de 10% la valeur de  $\overline{Mn}$  de polymères de type PPG et PEG. Dans notre cas, ce paramètre n'a pas été étudié et nous avons fixé le voltage à 5 kV pour l'analyse du mélange équimolaire de DP2 à 7 et des maltodextrines. Ce paramètre expérimental peut aussi, a priori, être une explication de la sous-estimation des hautes masses moléculaires. Enfin, nous pouvons suspecter un rendement d'ionisation dépendant de la taille

des oligosaccharides analysés pouvant encore expliquer cette sous-estimation importante par spectrométrie de masse.

De même, les Glucidex 19 et 12 analysés par spectrométrie de masse montrent un relatif bon accord de leurs masses moléculaires moyennes par MALD et ES et présentent une très grande différence avec les valeurs issues de la technique de chromatographie de filtration sur gel qui expriment une très importante sous-estimation. En 1995, Montaudo *et al.* ont démontré ce même phénomène appliqué aux polymères synthétiques et concluait que l'erreur augmente en fonction de l'augmentation de l'indice de polydispersité. La caractérisation des polymères que nous avons donc réalisée avec des polymères glucidiques polydispersés sont donc en accord avec ceux qui ont été décrits sur les polymères synthétiques.

Dans le cas de l'analyse par ES d'échantillons polydispersés natifs ou méthylés, la difficulté majeure réside en l'intégration des hautes masses moléculaires présentes sous forme de multichargés pouvant interférer avec la distribution primaire (Prokai *et al.*, 1993). A ce propos, une reconstitution des spectres des différentes maltodextrines natives et perméthylées a été effectuée en réalisant la somme des espèces moléculaires mono et dichargées. La distribution obtenue, présentée dans le cas du Glucidex 12, possède la même allure générale que les distributions obtenues par MALD et par chromatographie de filtration sur gel (Figure 34). Ce résultat implique que les espèces dichargées ont un coefficient de réponse proche de celui des espèces monochargées. La sous-estimation des masses moléculaires moyennes ne viennent donc pas du fait que nous avons attribué un coefficient de réponse identique pour les deux espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . Cette sous-estimation des valeurs de distribution glucidique peut être due à un rendement d'ionisation dépendant de la masse moléculaire des oligosaccharides constituant les polymères dispersés ou à une neutralisation par perte de cations lors de collisions dans l'interface ce qui favoriserait les basses masses moléculaires, ces hypothèses ont été émises par Guittard *et al.*, en 1997 à propos de polymères synthétiques analysés par ES. D'autre part, la technique ES produit un bruit de fond plus important sur les spectres que la technique MALD ce qui rend plus difficile l'intégration des espèces moléculaires.

La comparaison des différentes techniques avec la spectrométrie de masse permet aussi d'aborder l'influence de la réaction de perméthylation sur des polymères polydispersés lors des analyses par MALD et par ES. Cette dérivation qui présente des avantages certains pour l'analyse d'échantillons glucidiques monodispersés, dont l'augmentation de l'intensité de signal, l'incrément de masse qu'elle apporte (en éloignant les composés des pics de matrice

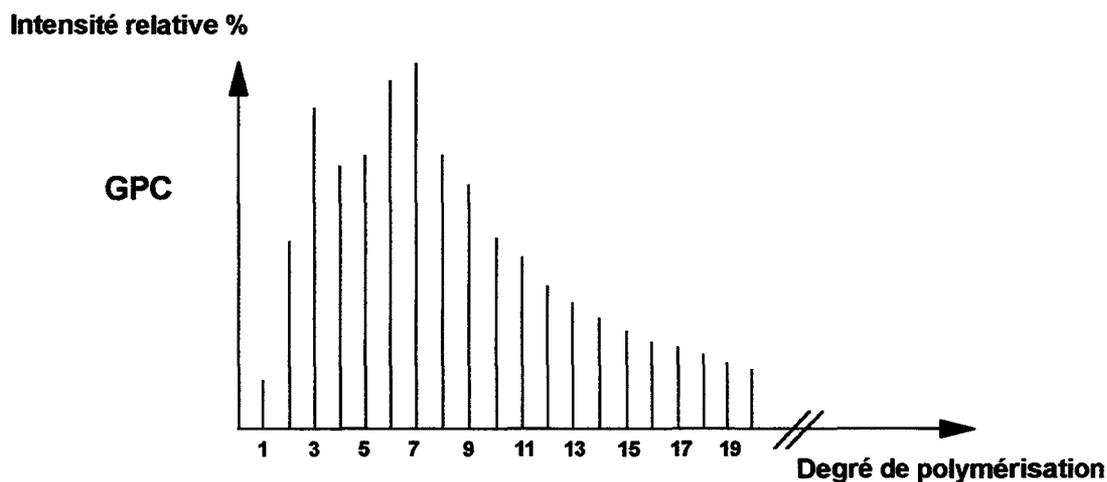
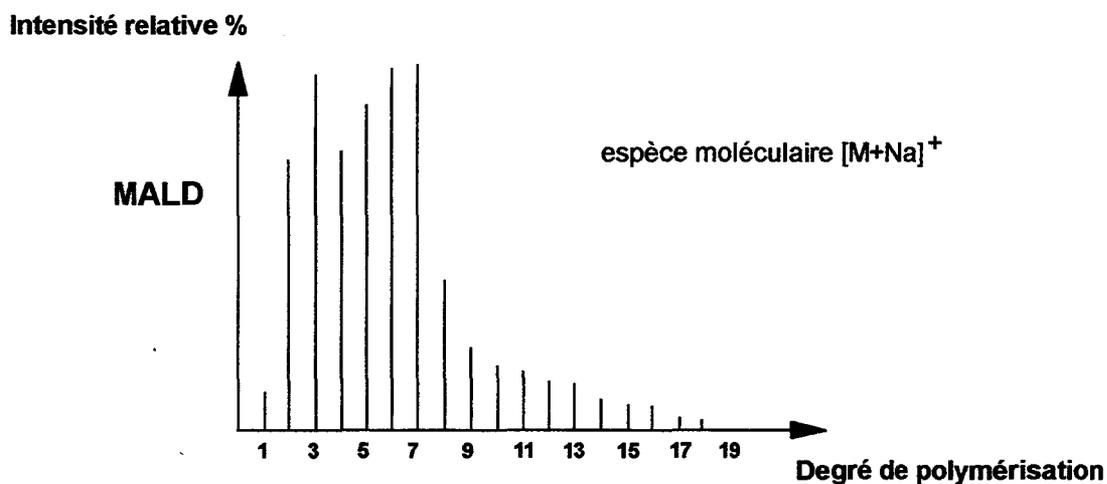
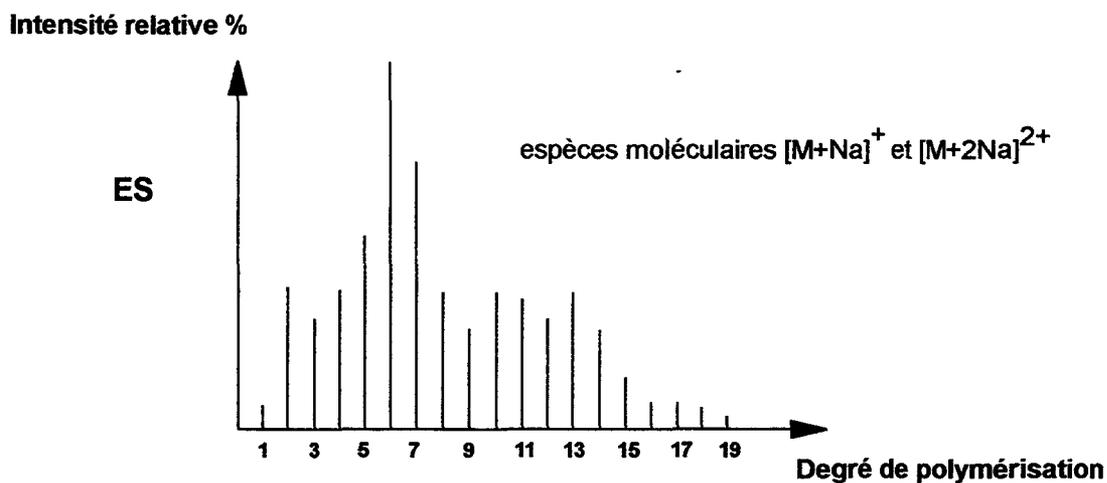


Figure 34: Comparaison des distributions glucidiques de la maltodextrine Glucidex 12 native obtenue par spectrométrie de masse et par chromatographie de filtration sur gel

lors d'une analyse MALD), peut aussi générer des inconvénients dont une augmentation de la volatilité des oligosaccharides de bas poids moléculaire induisant la perte d'une partie de ces composés en source ce qui implique une sous-estimation des plus bas DP lors des calculs de paramètres de distribution glucidique. De plus, Garrozzo *et al.* en 1995 a obtenu des  $\overline{Mn}$  de dextrans perméthylés inférieurs au  $\overline{Mn}$  du produit natif prouvant ainsi la grande difficulté à désorber et ioniser par MALD les molécules de hautes masses moléculaires d'un polymère polydispersé. D'autre part, l'augmentation de la masse des oligosaccharides natifs ainsi que les oligosaccharides perméthylés montrent une formation croissante des ions multichargés par ES. Le comportement des ions multichargés ainsi que la détermination de leur coefficient de réponse indispensable pour l'estimation des paramètres de répartition glucidique n'ont pas encore été décrit. A ce sujet, l'analyse de produits témoins de même nature que nos maltooligosaccharides et de masses moléculaires réparties sur toute la gamme de masse des polymères glucidiques pourrait apporter des éléments de réponse pour mieux comprendre les phénomènes de désorption et d'ionisation dans les hautes masses moléculaires par MALD et ES.

Plus récemment, ces mêmes auteurs ont apporté un élément de réponse pour une méthode d'évaluation des paramètres de distribution d'échantillons polydispersés et préconisent un fractionnement préalable des polymères afin d'obtenir des fractions d'indice de polydispersité proches de 1,0. Ces fractions peuvent alors être analysées par MALD ou par ES et servir à calibrer en masses moléculaires absolues la courbe de calibration de la chromatographie de filtration sur gel afin de déterminer les masses moléculaires moyennes. Cette procédure décrite par Garrozzo *et al.*, en 1995 et par Montaudo *et al.*, en 1996, pour des dextrans donne des résultats en masses moléculaires moyennes absolues qui présentent une bonne corrélation entre la filtration sur gel et le MALD. Notre expérience de fractionnement des polymères glucidiques qui sera détaillée dans le chapitre 3 des résultats est en accord avec les articles cités précédemment qui préconisent un fractionnement préalable des polymères afin de calibrer la chromatographie de filtration sur gel par la spectrométrie de masse. En effet, lors du fractionnement éthanolique de l'un de nos polymères glucidiques de type polydextrose, nous avons mis en évidence par MALD des degrés de polymérisation non suspectés dans les produits non fractionnés. A ce jour, cette méthode n'a pas été appliquée à l'analyse de polymères polydispersés par électrospray.

### 3. 7. Conclusion générale

La *fast atom bombardment* (FAB), l'*électrospray* (ES) et la *désorption laser assistée par une matrice* (MALD) sont trois techniques de spectrométrie de masse basées sur le processus de désorption. Les caractéristiques de ces techniques dont la formation d'ions stables, préexistants en solution et l'absence de fragmentation ont permis une analyse semi-quantitative de polymères glucidiques de type maltodextrine après optimisation des conditions expérimentales réalisées sur un mélange équimolaire de maltooligosaccharides de DP2 à 7. Les spectres ainsi obtenus présentent une intensité relative quasi équivalente de tous les composés maltooligosaccharidiques du mélange.

Comme nous nous y attendions, la technique FAB n'est pas du tout applicable à ce type d'approche pour plusieurs raisons à savoir la présence d'un bruit de fond important sur toute la gamme de masse et surtout la présence du phénomène de suppression qui génère des spectres non représentatifs de la distribution glucidique des produits. L'approche semi-quantitative des polymères glucidiques a alors été réalisée par MALD et ES.

Le but des analyses semi-quantitatives étant de corrélérer l'intensité des signaux à la quantité de produit présente dans l'échantillon. Cette application particulière de la spectrométrie de masse nécessite des conditions d'analyses clairement définies. Ainsi, l'application de la méthode de l'étalon interne utilisant la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) nous a permis de nous affranchir des différentes sources d'erreurs car l'échantillon et le standard interne, de propriétés physico-chimiques proches, subissent les mêmes manipulations, les mêmes pertes et les mêmes erreurs. Dans ce cas, le rapport des intensités relatives oligosaccharide/ $\beta$ -CD reste constant du début de la manipulation jusqu'à la fin de l'analyse par spectrométrie de masse. D'autre part, les analyses ont été réalisées dans la zone de linéarité afin d'être certain que nombres d'ions produits soit bien une fonction linéaire de la quantité de matériel utilisé. Enfin, le temps d'acquisition pour obtenir les spectres doit être suffisamment long pour être représentatif de l'échantillon.

Dans le cas des analyses par MALD et par ES, l'application des conditions expérimentales définies permet l'obtention de spectres correspondant aux maltodextrines natives et méthylées reproductibles et montrant une variabilité compatible avec une quantification.

Pourtant l'apparente facilité de réalisation d'une analyse par MALD ne doit pas faire oublier que cette technique présente de nombreuses sources de variabilité pouvant impliquer une fluctuation des résultats, notamment lors de la préparation des échantillons, de la co-

crystallisation et la désorption-ionisation des molécules. Lorsque ces paramètres sont fixés, la technique est tout-à-fait reproductible et ne montre apparemment pas de limite. En effet, la détermination des paramètres de répartition glucidique par spectrométrie de masse ne présente pas de difficulté majeure lorsque qu'il s'agit d'analyser des échantillons monodispersés ou faiblement dispersés. Dans ces conditions, les valeurs déterminées par spectrométrie de masse, par MALD (et par ES), sont en réelle adéquation. Par contre, lorsque les échantillons sont de nature polydisperse et les maltodextrines et polymères glucidiques de type polydextrose font partie de cette catégorie, la corrélation entre les différentes techniques de détermination de masses moléculaires moyennes est nettement plus délicate. Les constituants de bas poids moléculaires des polymères glucidiques interfèrent bien souvent avec les pics de matrice rendant alors difficile voire impossible l'intégration de ces espèces. Par ailleurs, les masses moléculaires moyennes des maltodextrines étudiées apparaissent largement sous-estimées par rapport aux valeurs obtenues par chromatographie de filtration sur gel. Cette sous-estimation est en accord avec celle obtenue par d'autres auteurs sur des polymères de nature glucidiques ou synthétiques. Les hypothèses proposées pour expliquer ce phénomène de discrimination dans les hautes masses d'un polymère dispersé sont entre autres une difficulté à désorber et ioniser des composés de hautes masses moléculaires quand elles se retrouvent dans un échantillon polydispersé ou un rendement d'ionisation variable en fonction de la taille des oligosaccharides.

La dérivation par perméthylation présentée comme une solution pour une augmentation de masse afin de déplacer la distribution des pics de matrice et pour une détection plus sensible des molécules renforce alors le problème de la désorption des hautes masses moléculaires. La méthylation augmente aussi la volatilité des composés de basses masses moléculaires, en particulier les DP1, 2 et 3, qui peuvent subir une faible perte en source et conduire à une sous-estimation des basses masses moléculaires. La technique MALD est pourtant adaptée à l'intégration des espèces moléculaires de très faible intensité grâce à un bruit de fond limité sur les spectres.

L'électrospray présente l'avantage de produire des espèces multichargées qui permettent de détecter des molécules possédant une masse moléculaire supérieure à la masse limite de l'analyseur pour des ions monochargés. L'analyse des polymères glucidiques natifs et perméthylés est alors tout à fait réalisable de façon reproductible. Les espèces moléculaires observées sur les spectres de maltodextrines natives et méthylées sont  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . Les masses moléculaires moyennes obtenues sur les maltodextrines natives et

méthylées présentent une bonne corrélation en tenant compte de certains facteurs dont la participation de la somme des intensités relatives des ions mono et dichargés pour l'estimation des masses moléculaires moyennes de produits méthylés et l'intégration des mono et dichargés lors que l'intensité de l'espèce dichargée représente environ 10% de celle de l'espèce monochargée lors que l'on analyse les produits natifs. Notre expérience sur des polymères glucidiques polydispersés montre que les valeurs expérimentales obtenues sont sous-estimées par rapport aux résultats issus de la chromatographie de filtration sur gel. A ce sujet, aucun autre travail ne faisant mention de la quantification de polymères glucidiques par électrospray, nous attribuons cette sous-estimation des valeurs de paramètres de distribution glucidique à une intégration incomplète des espèces multichargées ou à une discrimination des hautes masses par un rendement d'ionisation différent en fonction de la taille des oligosaccharides.

Les valeurs de paramètres de distribution glucidique ont été réalisées avec certaines approximations dont il ne faut pas négliger l'importance dont la méthode d'intégration manuelle de la hauteur des pics.

D'autre part, la comparaison des résultats obtenus par spectrométrie de masse et par chromatographie de filtration sur gel pose le problème de la validité de la détermination des masses moléculaires moyennes par cette seconde technique. En effet, les masses moléculaires moyennes déterminées sont des valeurs relatives en équivalent témoins de calibration et l'élution des produits est certainement différentes de celle des standards étant donné qu'ils ne possèdent ni la même structure, ni la même configuration spatiale. Ces facteurs sont autant de sources d'erreur pour la caractérisation de la distribution des polymères glucidiques par cette technique. Cependant les distributions glucidiques réalisées par spectrométrie de masse et par chromatographie de filtration sur gel possèdent, mis à part la discrimination évidente dans les hautes masses moléculaires, la même allure générale.

La caractérisation par MALD et ES que nous avons effectuée est une étape préliminaire pour une approche semi-quantitative des polymères glucidiques polydispersés par spectrométrie de masse. Le problème majeur réside en un manque de témoins purs, de même nature que les échantillons et de degré de polymérisation couvrant toute la gamme de masse des polymères à étudier. Ces témoins sont en effet indispensables pour l'optimisation des paramètres dans la gamme des hautes masses moléculaires et pour la connaissance des phénomènes de désorption et d'ionisation des constituants de hautes masses moléculaires de ces polymères glucidiques.

Cependant, cette méthode basée sur une optimisation grâce à des témoins que sont les maltooligosaccharides et les maltodextrines permet, malgré les nombreuses questions que nous avons soulevées, l'obtention de spectres reproductibles et de valeurs de paramètres de distribution glucidiques cohérentes dont une application sera la caractérisation par MALD et ES des polydextroses, polymères glucidiques complexes, et la comparaison des valeurs obtenues sur différents polymères. De plus, les analyses réalisées par spectrométrie de masse présentent l'avantage indiscutable de mener en parallèle la détermination des masses moléculaires moyennes et une étude structurale des polymères glucidiques.

Dans ce cas particulier d'analyses semi-quantitatives de polydextroses, polymères glucidiques constitués d'oligosaccharides de natures chimiques différentes, il sera indispensable de considérer une série homologue de produit car la caractérisation de plusieurs espèces au sein d'un même polymère compliquerait encore l'estimation des valeurs de  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$  par l'intervention du facteur de réponse de chacun des constituants. Nous avons notamment montré lors de l'étude de maltooligosaccharides réduits, la participation d'un coefficient de réponse dépendant de la taille de l'oligosaccharide. La quantification basée sur les composés homoglucose présentera également une source d'erreur potentielle car chaque oligosaccharide possède aussi un coefficient de réponse spécifique notamment des liaisons osidiques le constituant.

---

## **Chapitre 4**

### **Résultats et Discussion**

---

## CHAPITRE 4 . Caractérisation de polymères glucidiques de type polydextrose

La caractérisation de la distribution de polymères glucidiques complexes, c'est-à-dire la détermination des valeurs de masses moléculaires moyennes,  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$ , du degré de polymérisation moyen  $\overline{DP}$  et de l'indice de polydispersité  $I$ , a été effectuée en deux étapes. La première a été une approche globale par les techniques dites conventionnelles telles que la chromatographie de filtration sur gel, la résonance magnétique nucléaire et la cryométrie regroupées sous le terme générique d'études préliminaires. La seconde, plus originale, a été basée sur la potentialité de la spectrométrie de masse de mener d'une part une analyse structurale précise des constituants des polymères et d'autre part une étude semi-quantitative comme cela a été présenté dans le chapitre précédent pour les maltodextrines.

Les polymères analysés sont le polydextrose Pfizer A commercialisé par la société Pfizer et le polyglucose Roquette I, fabriqué en laboratoire au sein de la société Roquette. Tous deux sont issus de la réaction de polycondensation de monomères de glucose (et de sorbitol, pour le polydextrose Pfizer A) en milieu acide, sous pression et à chaud.

### 4. 1. Etudes préliminaires

Des études préliminaires comprenant la caractérisation du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I ainsi que les différentes maltodextrines, Glucidex 33, 19 et 12, qui nous ont servies de témoins, ont été réalisées par chromatographie de filtration sur gel, par cryométrie et par résonance magnétique nucléaire. Ces techniques, couramment usitées pour l'analyse de polymères de tous genres, reposent sur des principes différents. Aussi les paramètres déterminés sont différents en fonction de la technique. La chromatographie de filtration sur gel permet d'accéder aux quatre valeurs de distribution que sont les masses moléculaires moyennes en nombre et en poids,  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$ , le degré de polymérisation moyen  $\overline{DP}$  et l'indice de polydispersité  $I$  alors que la résonance magnétique nucléaire et la cryométrie permettent de déterminer uniquement le  $\overline{DP}$ . Ces éléments de réponse ont été ultérieurement comparés avec les estimations résultant de l'analyse par spectrométrie de masse.

#### 4. 1. 1. Chromatographie de filtration sur gel

La chromatographie de filtration sur gel développée dans les années 50 est un outil de choix pour la détermination de la répartition de l'ensemble des masses moléculaires d'un polymère. La séparation est basée sur le principe de la capacité des molécules à pénétrer un gel de porosité bien définie afin d'y être retenues. Les molécules sont donc séparées en

fonction de leur taille et donc à fortiori en fonction de leur masse moléculaire. L'élution se réalise dans l'ordre décroissant des masses moléculaires.

La chromatographie de gel filtration a été effectuée sur colonnes Shodex 805, 803, 802 montées en série et étalonnées grâce à des standards répartis sur une gamme de masse moléculaire très étendue comprenant principalement divers pullulans et les maltooligosaccharides de DP7 à 2. Ces témoins ont servi à tracer la courbe de calibrage  $\log(MM) = f(\text{temps de rétention})$  permettant d'évaluer l'enveloppe glucidique à partir du temps d'élution des constituants des polymères.

Les maltodextrines, Glucidex 33, 19 et 12, ainsi que le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I ont ensuite été analysés dans les mêmes conditions afin de déterminer le  $\overline{Mn}$ , le  $\overline{Mp}$ , le  $\overline{DP}$  et l'indice de polydispersité  $I$  correspondants. Le calcul géré par ordinateur réalise la démarche suivante: au temps d'élution  $T_i$ , on dispose d'une hauteur  $h_i$  représentant le signal du réfractomètre. Grâce à la courbe de calibration, à ce même temps d'élution  $T_i$ , on détermine la masse moléculaire  $M_i$  de l'espèce. La hauteur  $h_i$  représente la concentration moléculaire de l'espèce  $M_i$  et cela quelle que soit cette masse sur l'ensemble de la distribution. Les valeurs de  $h_i$  déterminées pour chaque  $M_i$  remplacent celles de  $n_i$  dans les calculs de masses moléculaires moyennes. Comme exemple, le profil d'élution du polydextrose Pfizer A est représenté dans la Figure 35 où le temps de rétention des témoins de la calibration a été mentionné sur une double échelle. La distribution glucidique du polydextrose Pfizer A montre des masses allant environ de 100 jusqu'à 11.000 Da. Pour le polyglucose Roquette, les masses moléculaires les plus hautes détectées sont égales à environ 16.000 Da. Les résultats des calculs de paramètres glucidiques obtenus avec les maltodextrines et les polymères sont rassemblés dans le Tableau 18.

Tableau 18: Valeurs caractéristiques des maltodextrines Glucidex, du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette, obtenues par chromatographie de filtration sur gel

	$\overline{Mn}$	$\overline{Mp}$	$\overline{DP}$	$I$
<b>Glucidex 33</b>	600	1950	3,6	3,2
<b>Glucidex 19</b>	1150	9000	7,0	7,8
<b>Glucidex 12</b>	1800	16200	11,0	9,0
<b>Roquette I</b>	830	1660	5,0	2,0
<b>Pfizer A</b>	710	1550	4,3	2,2

Indice de réfraction

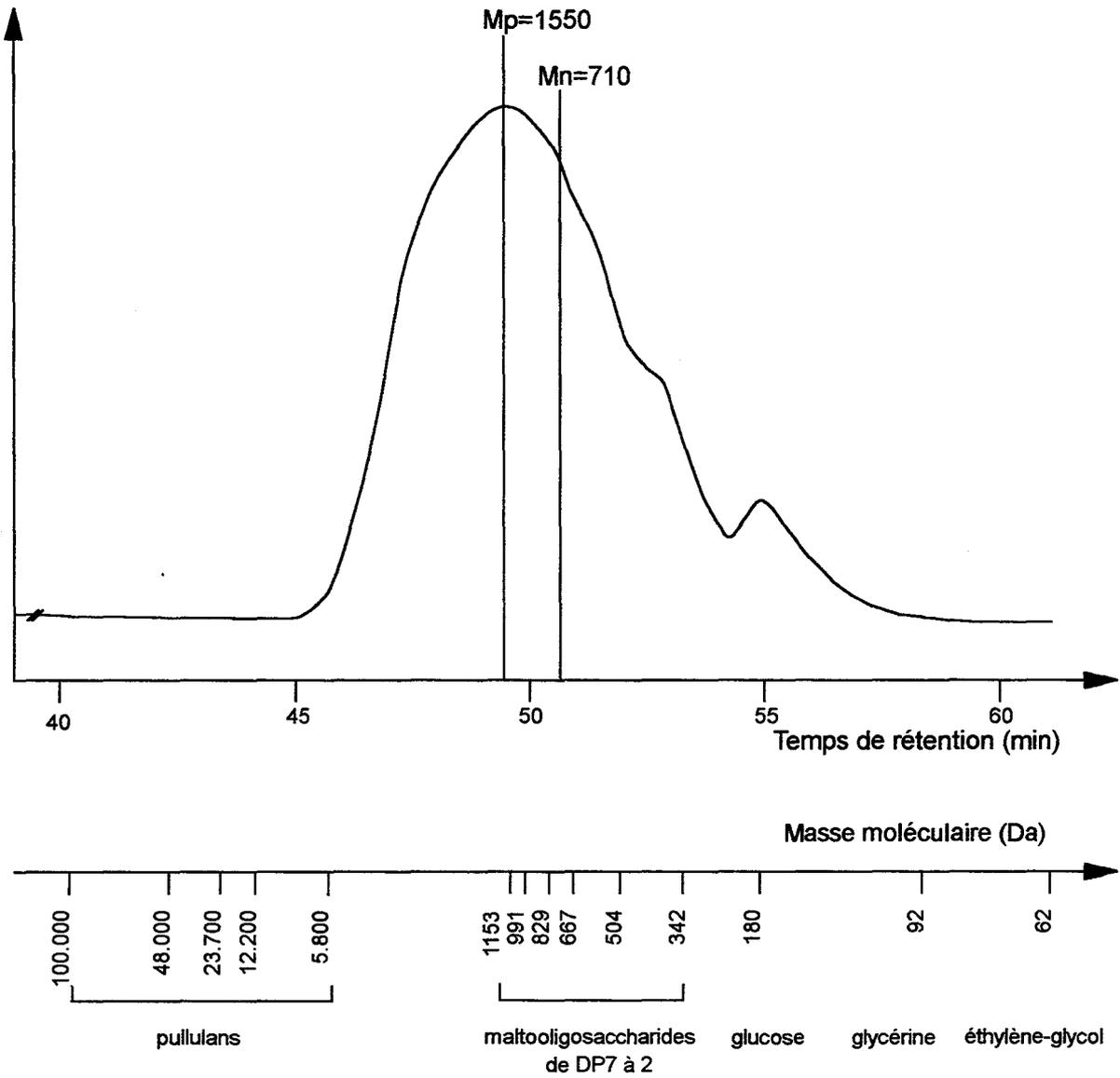


Figure 35: Chromatogramme de filtration sur gel du polydextrose Pfizer A (colonnes Shodex 802, 803 et 805 montées en série)  
La seconde abscisse montre l'éluion des différents standards utilisés pour la calibration.

L'utilisation d'une technique et la bonne interprétation des résultats acquis exigent de connaître ses limites et ceci, d'autant plus, lorsque l'on prévoit de comparer des techniques entre elles. Pour se faire, il est important de rappeler que la chromatographie de filtration sur gel est une technique basée sur la calibration de la colonne en masses relatives grâce à des standards et que les résultats sont exprimés, dans notre cas, en équivalents pullulans et maltodextrines au lieu de donner des masses absolues. Indépendamment, il est toujours difficile d'estimer les basses masses moléculaires et les hautes masses moléculaires. Lors de l'intégration, on estime en effet que la hauteur du signal représente la concentration de l'espèce. Dans le cas des basses masses moléculaires, cette relation n'est pas vérifiée car pour qu'elle le soit, il faudrait une calibration masse par masse qui n'est techniquement pas réalisable. Pour l'incertitude dans les plus hautes masses moléculaires, la troncature, c'est à dire l'endroit où l'on décide d'arrêter la distribution, a un effet important sur la variation de la masse moléculaire moyenne en poids et de l'indice de polydispersité. La chromatographie de gel filtration demande aussi que les échantillons soient parfaitement dissous dans la phase mobile. Le non respect de cette condition provoquerait un aplatissement exagéré de la distribution.

En conclusion, nous observons que les produits de dégradation de l'amidon que sont les Glucidex 12, 19 et 33, donnent des valeurs de  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$  très différentes exprimant un degré d'hydrolyse croissant. La comparaison des résultats entre les témoins et les valeurs résultant de l'analyse des polymères complexes, montre que le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I possèdent des caractéristiques de répartition glucidiques proches et du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le Glucidex 33. Le degré de polymérisation moyen des deux produits se situe entre 4 et 5. Il est important de remarquer que les deux produits possèdent un indice de polydispersité inférieur à celui déterminé pour le Glucidex 33 et proche de 2. Le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I peuvent donc être qualifiés de polymères glucidiques faiblement dispersés.

#### 4. 1. 2. Cryométrie

La cryométrie est une technique rapide couramment utilisée pour mesurer l'osmolalité d'une solution et la masse moléculaire du soluté. Une lecture directe sur l'appareil donne l'osmolalité de la solution en Osmoles par kg. L'abaissement cryoscopique ( $\Delta T$ ), c'est-à-dire la différence de température de congélation entre la solution contenant le soluté et le solvant pur, est proportionnel à la pression osmotique et donc à l'osmolalité. L'abaissement cryoscopique et l'osmolalité sont liés par la relation  $\Delta T = Osmol. \times K$  dans laquelle  $K$  est la constante cryoscopique, égale à 1,86 quand l'eau est utilisée comme solvant. Cette

technique nous a permis, à partir des différents maltooligosaccharides de DP2 à 7 à notre disposition, de déterminer des abaques démontrant la relation linéaire entre l'abaissement cryoscopique et la concentration pour une masse moléculaire donnée (Figure 36). Les valeurs expérimentales d'osmolalité obtenues avec le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I à trois concentrations différentes permettent de calculer l'abaissement cryoscopique. Cette valeur permet alors de déterminer le degré de polymérisation moyen des espèces en solution par lecture des abaques en se plaçant à une concentration donnée (Tableau 19).

Tableau 19: Estimation par cryométrie du  $\overline{DP}$  des Glucidex 33, 19 et 12, du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I

	Concentration (g/1000g de solvant)	Osmolalité (m.osmol/kg)	Abaissement cryoscopique	$\overline{DP}$
<b>Glucidex 33</b>	100 p 1000	169	0,31	3,5
<b>Glucidex 19</b>	100 p 1000	85	0,15	7
<b>Glucidex 12</b>	100 p 1000	57	0,10	11
<b>Pfizer A</b>	100 p 1000	156	0,28	4
	150 p 1000	230	0,42	4
	200 p 1000	358	0,65	3,7
<b>Roquette I</b>	50 p 1000	68	0,12	4
	100 p 1000	153	0,28	4
	150 p 1000	256	0,47	4

La cryométrie est une technique relativement fiable, simple, rapide (environ 2 minutes sont nécessaires pour réaliser une mesure) et qui ne demande pas de préparation au préalable de l'échantillon. Pourtant, quand la masse moléculaire augmente, nous l'observons déjà pour la maltodextrine Glucidex 12, la technique devient de moins en moins fiable car l'osmolalité est de plus en plus faible et l'abaissement cryoscopique tend vers 0. D'autre part, il faut noter que cette technique est particulièrement sensible aux impuretés de faible masse moléculaire, et surtout s'il s'agit d'électrolytes. En effet, pour un faible pourcentage pondéral d'impuretés, la solution présente un nombre d'osmoles élevé.

Abaissement du point de congélation (°C)

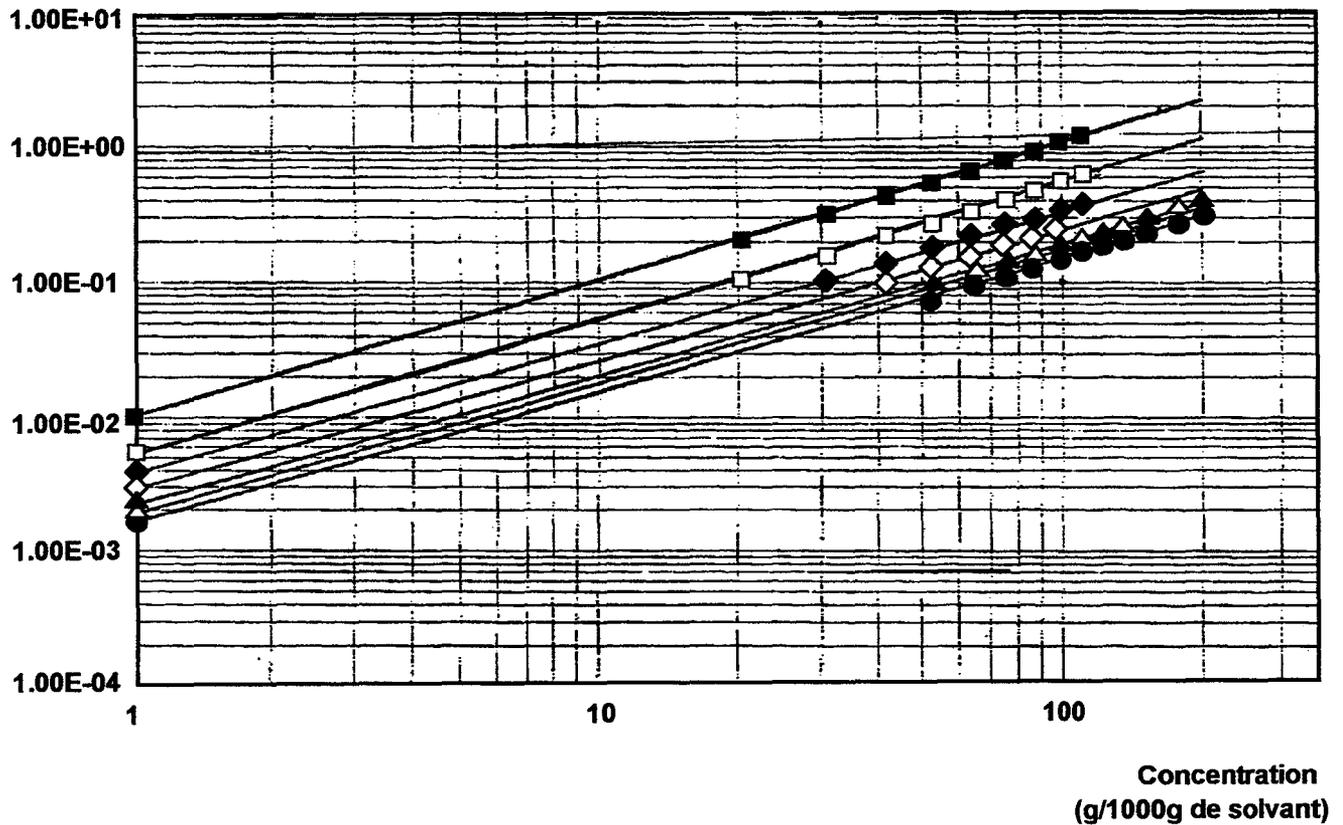


Figure 36: Cryométrie - Droites de calibration réalisées avec le glucose et les maltooligosaccharides de DP2 à 7 pour les mesures de degré de polymérisation moyen

En conclusion, les résultats présentent une très bonne reproductibilité et montrent une bonne corrélation entre les valeurs de  $\overline{DP}$  obtenues pour les Glucidex et leur degré d'hydrolyse. Le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I donnent par cette technique un degré de polymérisation moyen de 4 exprimé en équivalent maltodextrines. Il ne faut pourtant pas oublier que cette technique possède ses limites dont une sensibilité importante aux basses masses moléculaires et la difficulté d'analyser des masses moléculaires élevées ce qui induit des erreurs lors de l'analyse de polymères dispersés.

#### 4. 1. 3. Résonance magnétique nucléaire

Le spectre RMN du proton d'une maltodextrine montre tous les protons de la molécule et notamment les protons  $H_1$ . On distingue deux types de protons  $H_1$ , ceux portés par les carbones engagés dans les liaisons glycosidiques  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-6)$  et ceux qui sont terminaux encore appelés  $H_1$  terminaux réducteurs, sous forme  $\alpha$  et  $\beta$  à l'équilibre. La Figure 37 présente, comme exemple de maltodextrine, le spectre du proton du Glucidex 33.

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre Généralités, quand les pics sont bien résolus, l'intégration de la surface des pics est réalisable en vue de l'estimation du degré de polymérisation de la molécule. En effet, la surface d'un pic est proportionnelle au nombre de protons responsable du signal. Pour se faire, on pose comme hypothèse qu'un polymère est composé d'un oligosaccharide unique de taille égale à la composante la plus représentative c'est-à-dire son degré de polymérisation moyen. D'autre part, on fixe la somme de la surface des pics correspondant aux protons anomériques  $\alpha$  et  $\beta$  égale à 1 car l'oligosaccharide ne possède qu'une seule extrémité réductrice. Le degré de polymérisation moyen est alors déduit par simple règle de trois ou  $\overline{DP} = [(\alpha_{1,4} + \alpha_{1,6}) / (\alpha_R + \beta_R)]$ . On ajoute 1 à la valeur obtenue, il correspond au monomère terminal réducteur. Le Tableau 20 regroupe les intégrations de pics obtenues pour les maltodextrines Glucidex 33, 19 et 12 et le degré de polymérisation estimé par calcul.

Les résultats obtenus avec les Glucidex 33 et 19 sont donnés avec une marge d'erreur de l'ordre de 10%. Pour le Glucidex 12, l'erreur devient plus importante car l'analyse est réalisée à la limite du domaine d'application de la technique. En effet, lorsque la maltodextrine est faiblement hydrolysée, les surfaces de pics correspondant aux protons terminaux réducteurs  $\alpha$  et  $\beta$  sont de faibles intensités et les surfaces de pics sont difficiles à intégrer. Dans ce cas, les résultats sont donc moins fiables mais permettent tout de même des évaluations semi-quantitatives du degré de polymérisation moyen (Mc Intyre *et al.*, 1990).

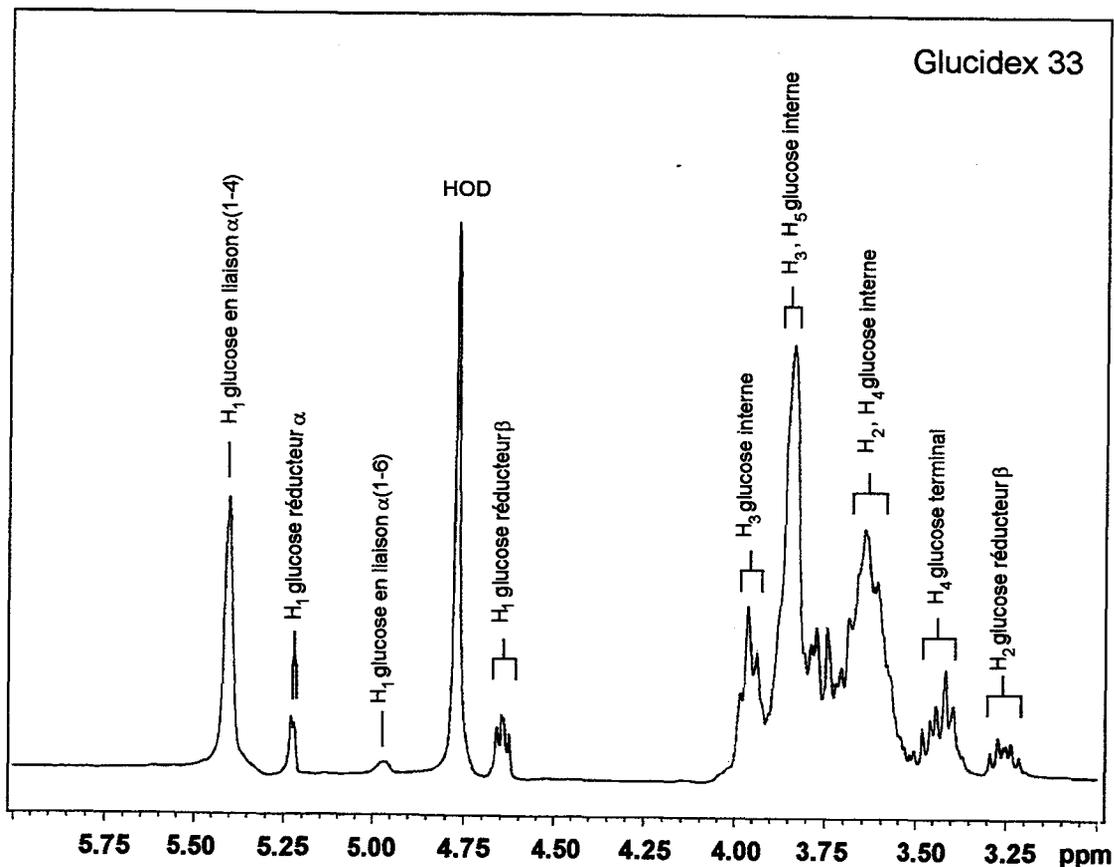


Figure 37: Spectre RMN du proton de la maltodextrine Glucidex 33

Tableau 20: Surfaces des pics des protons  $H_1$  des maltodextrines Glucidex 33, 19 et 12 et estimation du degré de polymérisation moyen par calcul.

Echantillon	Surface de pic des protons $H_1$ *				$\overline{DP}$
	$\alpha(1-4)$ %	$\alpha(1-6)$ %	$\alpha_R$ %	$\beta_R$ %	
Glucidex 33	68,65	4,15	10,01	17,09	3,7
Glucidex 19	80,70	3,44	6,42	9,47	6,3
Glucidex 12	85,27	3,69	4,3	6,84	8,0

\* la somme des surfaces des pics correspondant au  $H_1$  est égale à 100.

Malheureusement, par cette méthode, il n'a pas été possible de déterminer le degré de polymérisation moyen de produits plus complexes tels que le polyglucose Roquette I et le polydextrose Pfizer A. Une fraction importante du Pfizer A est sous forme d'oligosaccharides alditols et ces constituants n'ont donc pas de proton anomérique. Comme nous le montre les spectres RMN de la Figure 38, les produits possèdent apparemment une plus grande hétérogénéité de structure que les maltodextrines, exprimée par de nombreux pics non attribués et/ou non résolus et qui ne peuvent donc pas être intégrés.

Pourtant cette technique nous permet d'obtenir des renseignements de nature analytique au sujet du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I. La première indication est que les proton  $H_1 \alpha$  et  $\beta$  sont visibles sur les deux spectres démontrant que la longueur moyenne des oligosaccharides constituant les polymères glucidiques ne doit pas être trop élevée et comparable à celle des constituants du Glucidex 33. Les spectres montrent aussi que les produits issus de polycondensation possèdent des liaisons glycosidiques de différents types et plus particulièrement des liaisons  $\alpha(1-6)$  et  $\alpha(1-4)$ . Les liaisons  $\alpha(1-6)$  sont les plus représentées. D'autre part, différents signaux  $H_1$  indiquent la présence de 1,6 anhydroglucose libre sous forme pyranique et furanique respectivement à 5,10 et 5,45 ppm. Les signaux à 4,15 et 4,45 ppm correspondent au  $H_6$  de l'anhydroglucose 1,6 libre sous les formes pyranique et furanique. Les spectres ont été comparés aux produits témoins. Enfin pour le polydextrose Pfizer A, le quadruplet à 2,8 ppm est caractéristique du monomère d'acide citrique libre. La zone entre 3 et 4 ppm présente un large massif de pics non résolus confirmant l'hétérogénéité importante de structure.

Pour conclure, l'analyse par résonance magnétique nucléaire du proton est une technique qui nous a permis de déterminer de façon fiable le degré de polymérisation moyen de maltodextrines jusqu'à la limite d'intégration de la surface des pics des protons  $H_1 \alpha$  et  $\beta$  réducteurs. Cette limite est environ un  $\overline{DP}$  de 15. Par contre, cette méthode d'estimation du degré de polymérisation moyen est impossible à appliquer pour les produits issus de polycondensation. Les spectres correspondant au polydextrose Pfizer A et au polyglucose Roquette I nous ont montré une extrême hétérogénéité de structure exprimée par des massifs de pics non résolus qui rendent l'attribution complète des pics impossible.

En outre, ces analyses apportent des éléments de structures intéressants dont la mise en évidence d'anhydroglucoses en 1,6 libres sous formes pyranique et furanique et la présence de liaisons glucidiques  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-6)$  dans les deux polymères. Les liaisons  $\alpha(1-6)$  sont majoritaires.

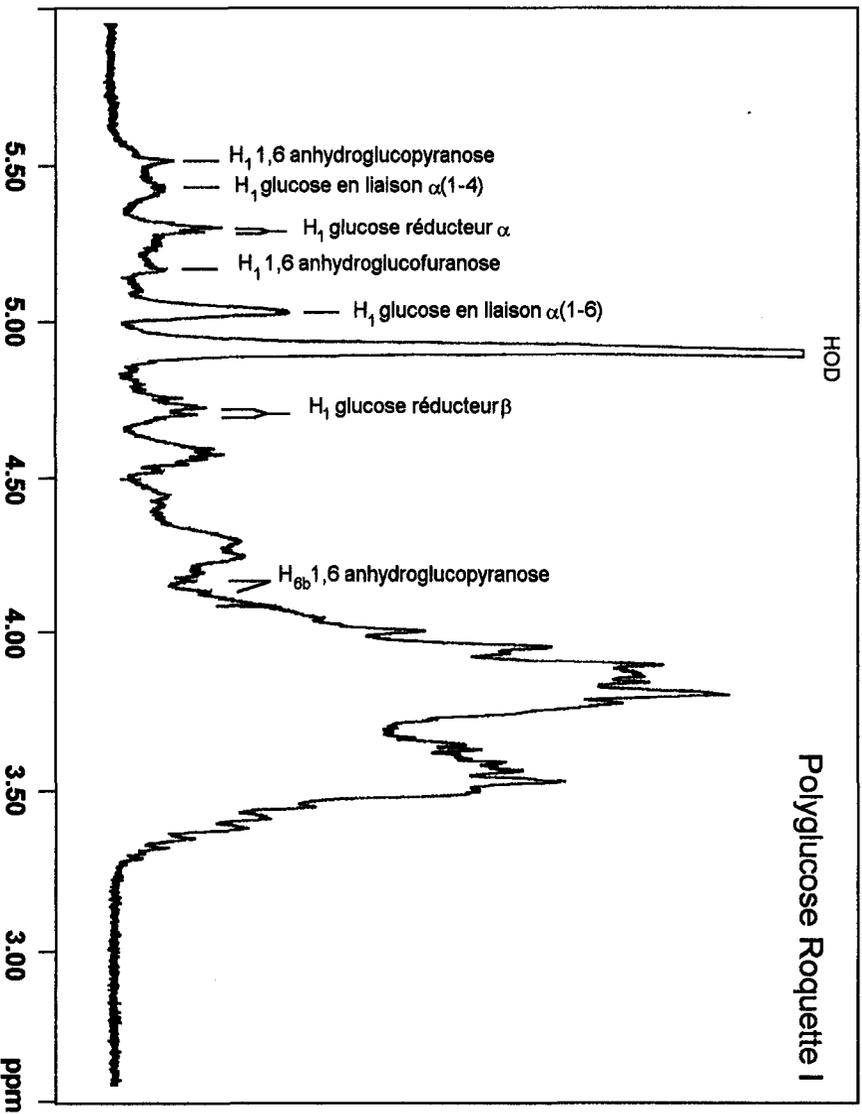
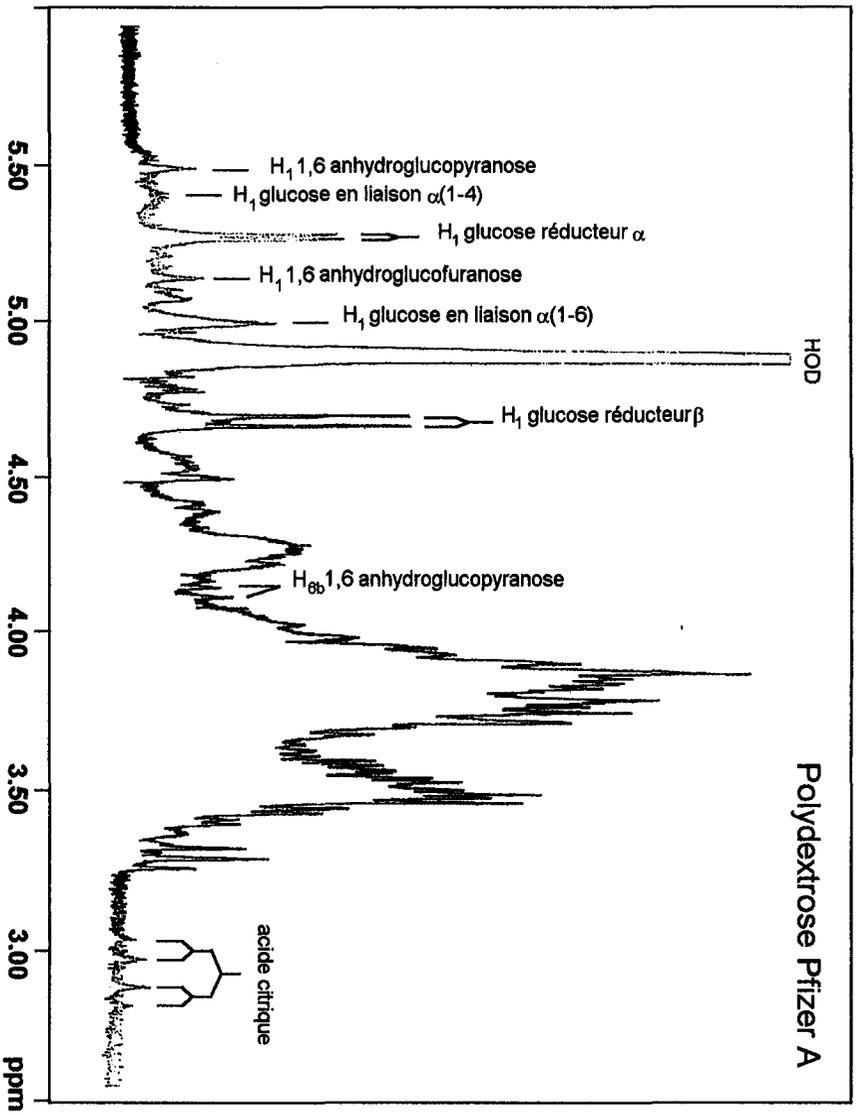


Figure 38: Spectres RMN du proton du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I

## 4. 2. Caractérisation par spectrométrie de masse

Les études préliminaires présentées dans le paragraphe précédent nous ont montré la possibilité d'une part, d'estimer les quatre valeurs de distribution glucidique par chromatographie de filtration sur gel et uniquement le degré de polymérisation moyen par cryométrie; et d'autre part, de démontrer une hétérogénéité de structure relativement importante des polymères issus de polycondensation ainsi que quelques éléments de structure par résonance magnétique nucléaire.

Ces techniques nous ont permis de réaliser une première caractérisation de la distribution glucidique des polymères et une esquisse de structure. Ces renseignements sont certes très informatifs mais aucune de ces techniques n'est capable de réaliser simultanément l'analyse qualitative et quantitative des produits. Aussi, les résultats présentés dans le cadre de la caractérisation par spectrométrie de masse vont tenter de relever ce défi en analysant selon ces deux orientations le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I par MALD et ES. Les spectres MALD et ES obtenus dans les conditions particulières d'optimisation définies dans le chapitre 1 ont été réalisés en vue de l'analyse semi-quantitative. Parallèlement, ils ont contribué à l'approche structurale des polymères glucidiques.

L'ensemble des masses  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$  correspondant aux espèces moléculaires décrites dans les polymères est regroupé dans la partie Annexe.

### 4. 2. 1. Analyses qualitatives par MALD et ES

Lors des analyses par spectrométrie de masse, MALD et ES, les conditions expérimentales ayant une influence sur la nature des espèces moléculaires sont à préciser pour la compréhension des spectres décrits ci-après. Le dopage au sodium (P316) de la matrice (DHB) explique l'apparition de la seule espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  par MALD. L'utilisation d'acétate de sodium 0,2 mM engendre les espèces moléculaires monochargées  $[M+Na]^+$  et dichargées  $[M+2Na]^{2+}$  par ES. Ces conditions ont été déterminées dans le but de produire un nombre limité d'espèces moléculaires par oligosaccharide présent dans les polymères.

#### Analyses par MALD

Le polyglucose Roquette I natif, représenté par le spectre de la Figure 39, montre une distribution commençant à  $m/z$  égal à 365 et dont l'incrément de masse entre chaque massif de pics est de 162. Cette série homologue correspond à l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  des homopolymères de glucose appelés plus communément les degré de polymérisation 2, 3, etc. Parallèlement une autre série apparaît sur le spectre au niveau de chaque degré de polymérisation. Elle se situe à 18 unités de masse inférieures à la série des homoglucooses.

Cette différence de masse correspond à la perte d'une molécule d'eau d'un résidu de glucose. Ces produits forment une série qui possède également un incrément de masse de 162. Etant donnée, la mise en évidence d'anhydroglucose libre par RMN, ce résultat suggère, à chaque degré de polymérisation, la présence d'oligosaccharides constitués de résidus de glucose et d'un résidu d'anhydroglucose.

Le polydextrose Pfizer A natif, montré par le spectre de la Figure 40, est constitué de l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  des deux séries précédemment décrites dans le polyglucose, les homoglucooses à  $m/z$  365, 527, 689 etc. et les oligosaccharides composés de glucose et d'un résidu d'anhydroglucose à  $m/z$  347, 509, 671 etc. Une troisième série, supérieure de 2 unités de masse par rapport à la série des homoglucooses est aussi présente à chaque degré de polymérisation. Comme le glucose et le sorbitol sont les monomères utilisés pour la fabrication du produit, nous en avons déduit que le sorbitol s'est condensé lors de la réaction de polycondensation aux molécules de glucose pour former la famille des oligosaccharides alditols à  $m/z$  367, 529, 691 etc.

L'analyse des produits perméthylés nous a permis de confirmer des résultats précédents. Les spectres obtenus montrent l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  majoritaire. Le polyglucose Roquette I perméthylé présente un spectre (Figure 41) montrant la famille des homoglucooses à  $m/z$  477, 681, 885, etc. et la famille des anhydroglucooses à  $m/z$  431, 635, 839, etc. La différence entre les deux espèces perméthylées est de 46. Pour le polydextrose Pfizer A perméthylé, le spectre de la Figure 42 présente les deux familles précédemment décrites chez le polyglucose et la famille des oligosaccharides alditols à  $m/z$  493, 697, 901, etc. De plus, la méthylation, reconnue pour augmenter l'intensité des signaux, mais aussi grâce à l'augmentation de l'incrément de masse entre les espèces qu'elle apporte, a permis de mettre en évidence dans le polydextrose Pfizer A une quatrième famille de constituants présents à  $m/z$  447, 651, 855, etc. Cette série de produits présente une différence de masse de 46 avec la série des alditols et peut être une famille d'anhydroalditols c'est-à-dire des oligosaccharides possédant un résidu d'anhydrosorbitol par oligosaccharide. Dans le produit natif, cette espèce possède un  $m/z$  égal à 673 (cas d'un DP4) de faible intensité et se retrouve dans la distribution isotopique de l'espèce glucose-anhydroglucose.

Sur le spectre du polydextrose Pfizer A natif, la série des homoglucooses à  $m/z$  365, 527, etc. est à peine visible et apparaît minoritaire par rapport aux oligosaccharides à sorbitol. Cette même constatation peut être faite sur le spectre du produit méthylé, où tous les pics apparaissent mieux.

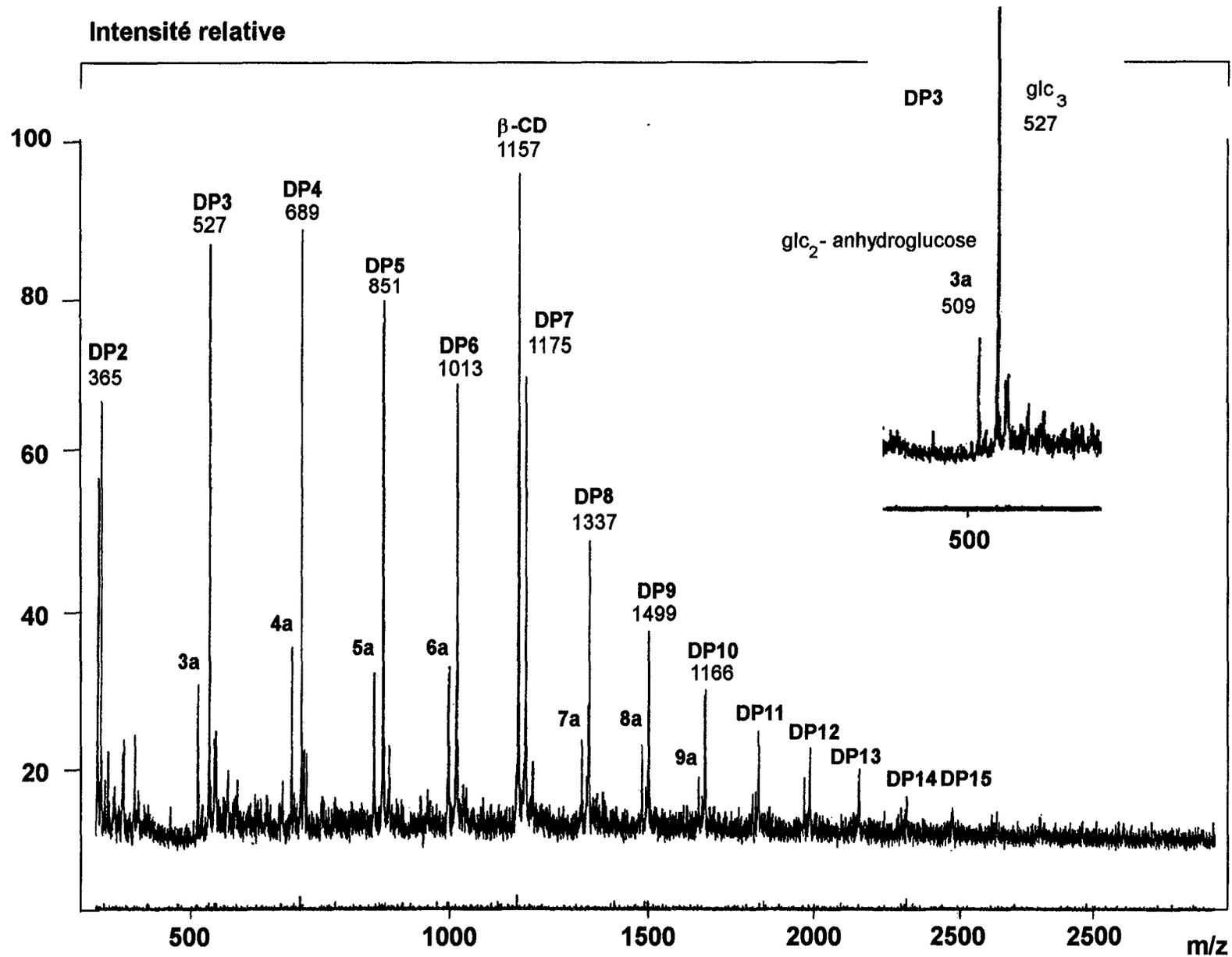


Figure 39: Spectre MALD du polyglucose Roquette I natif

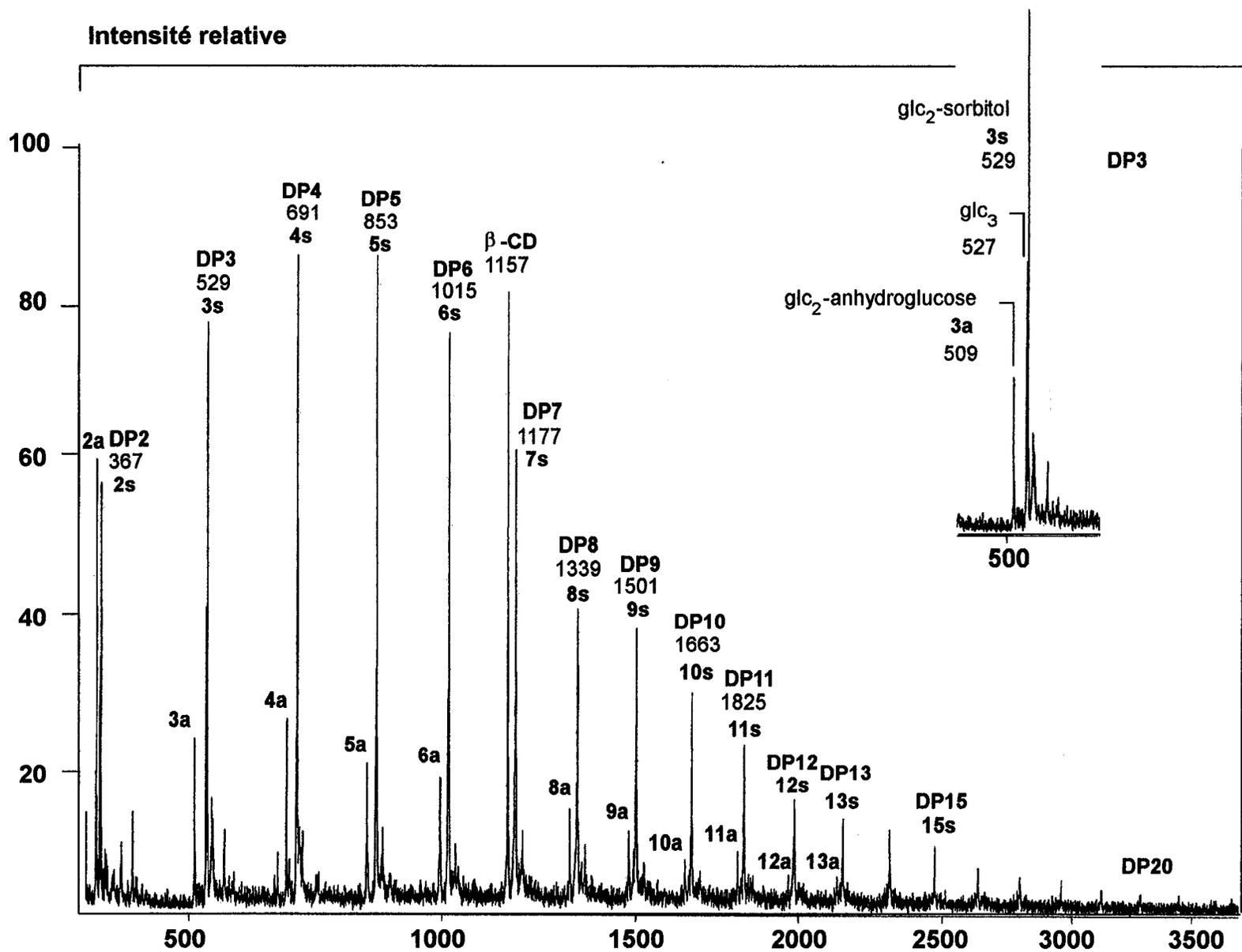


Figure 40: Spectre MALD du polydextrose Pfizer A natif

Intensité relative

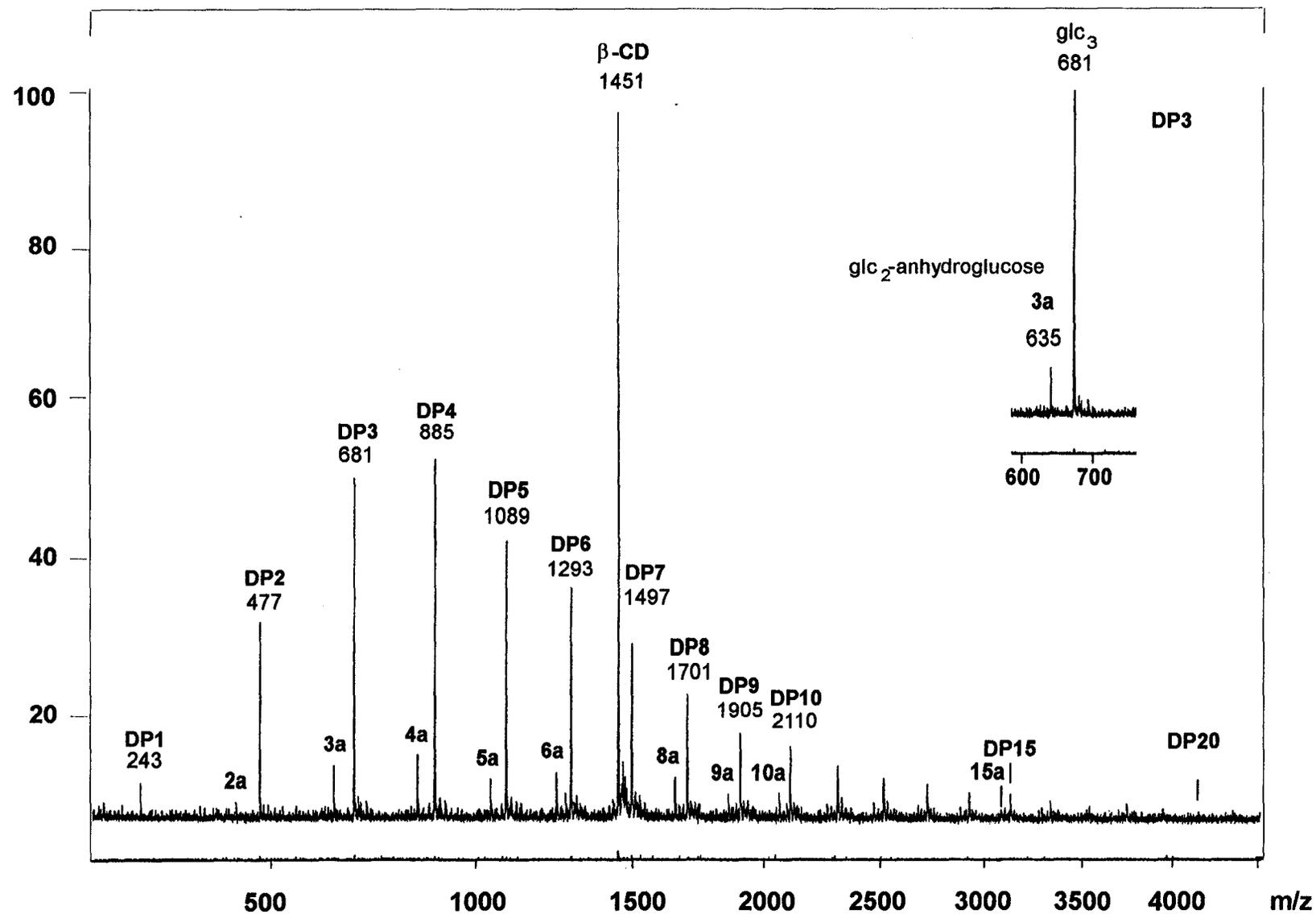


Figure 41: Spectre MALD du polyglucose Roquette I méthylé

Intensité relative

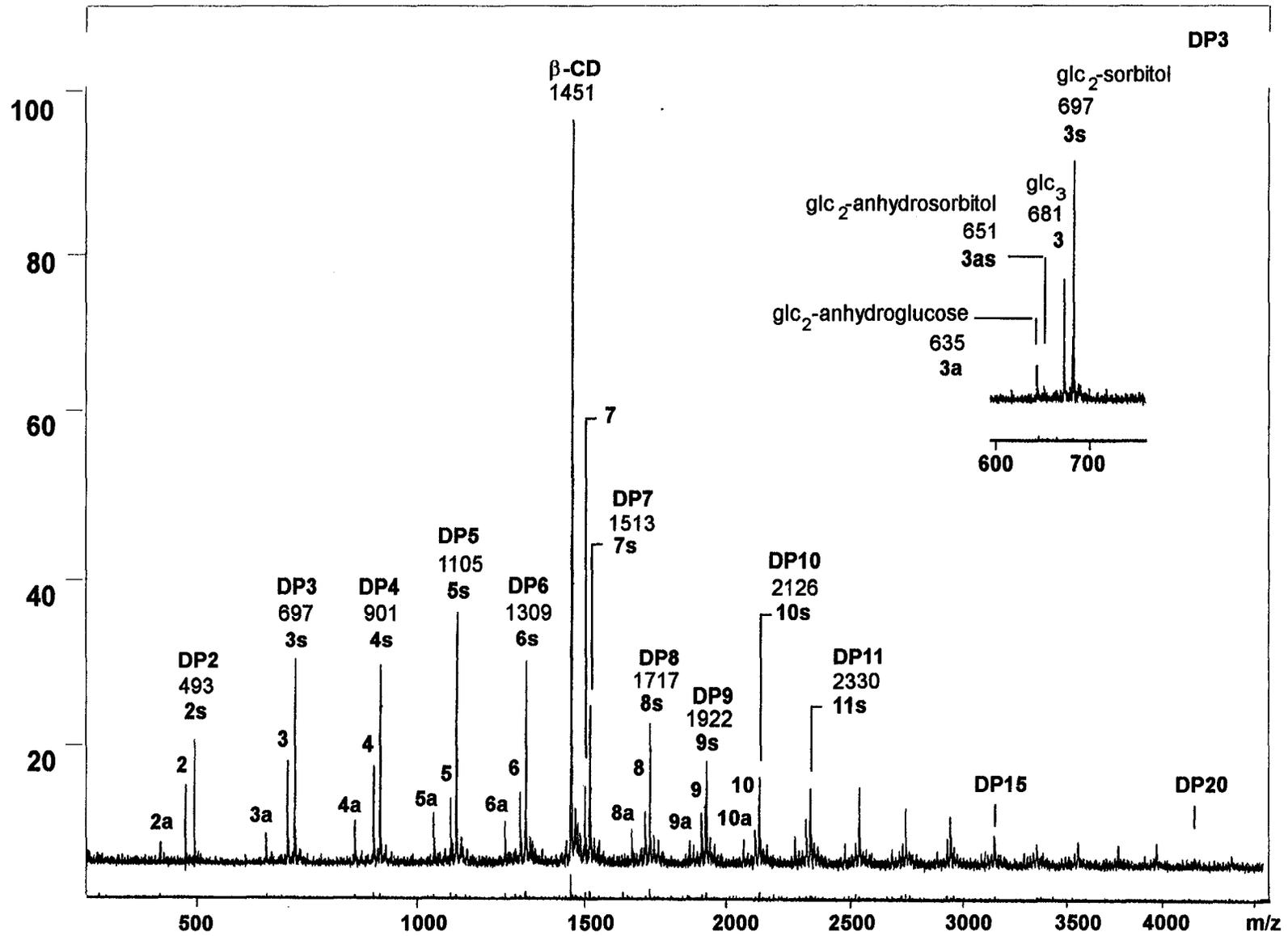


Figure 42: Spectre MALD du polydextrose Pfizer A méthylé

## Analyses par ES

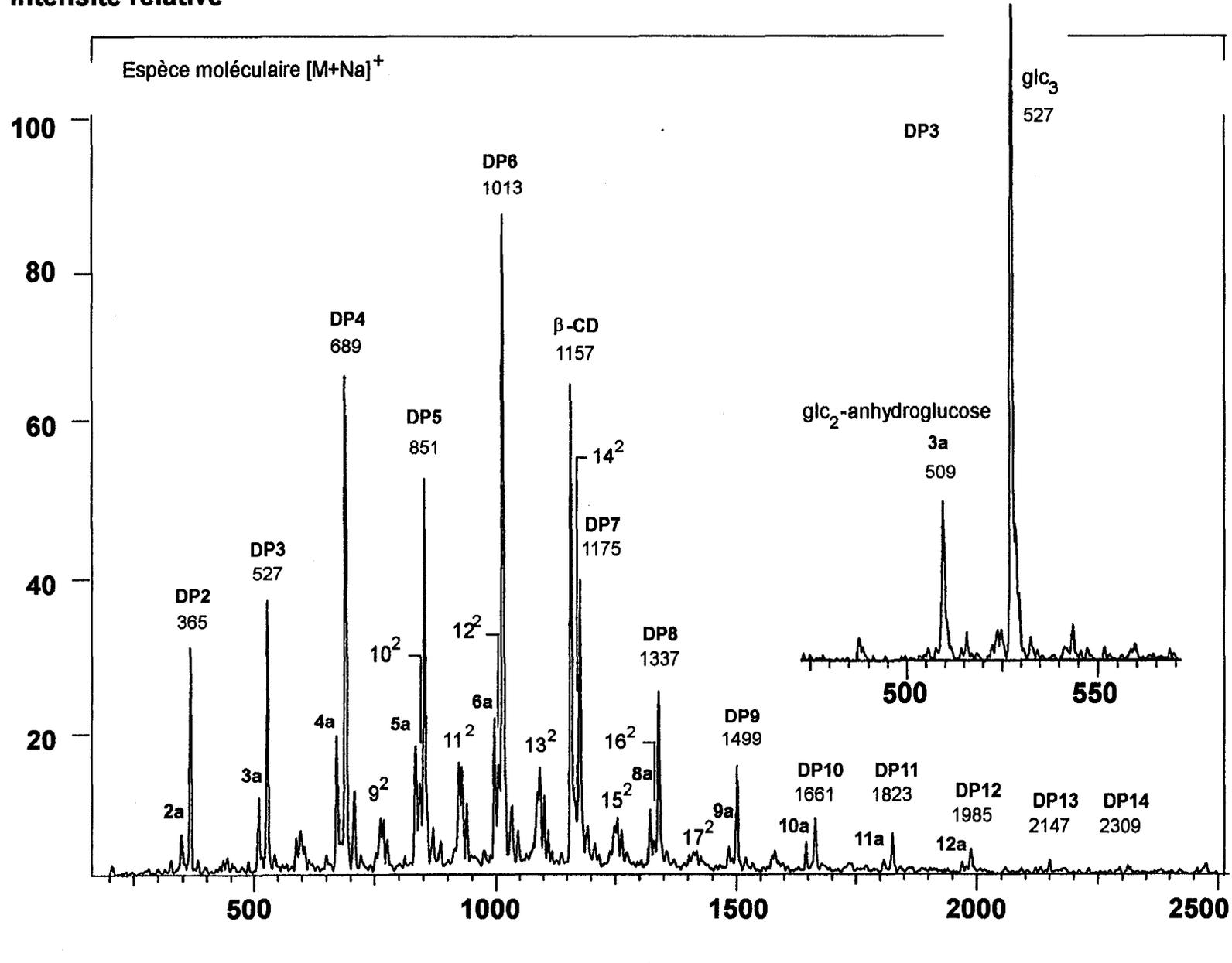
Les produits natifs et méthylés analysés par ES donnent, comme lors des analyses des analyses de maltodextrines, les espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . L'étude de l'espèce  $[M+Na]^+$  correspondant aux différentes familles de produit confirme les résultats précédemment obtenus par MALD. Le polyglucose Roquette I natif (Figure 43) est constitué de la série des homoglucooses à  $m/z$  365, 527, 689, etc. et de la série où un résidu de glucose est remplacé par un résidu d'anhydroglucose à  $m/z$  347, 509, 671, etc. Lorsque le polyglucose est perméthylé (Figure 45), les valeurs de  $m/z$  sont respectivement 477, 681, 885, etc. et 431, 635, 839, etc. pour les deux familles.

Concernant le polydextrose Pfizer A, aux familles décrites précédemment, le sorbitol intégré au polymère glucidique donne lieu à deux familles supplémentaires, la famille des alditols respectivement présents à  $m/z$  367, 529, 691, etc. sur le spectre du produit natif (Figure 44) et  $m/z$  493, 697, 901, etc. sur le spectre du produit méthylé (Figure 46) et les anhydroalditols à  $m/z$  349, 511, 673, etc. dans le produit natif et à  $m/z$  447, 651, 855, etc. dans le produit perméthylé. Comme, lors des analyses par MALD, les oligosaccharides alditols apparaissent majoritaires sur les spectres du produit natif et méthylé.

Pour conclure, la spectrométrie de masse utilisant les techniques ionisation MALD et ES nous a permis de progresser dans la connaissance de la structure des polymères glucidiques issus de polycondensation. En effet, la littérature se référant au polydextrose Pfizer A décrit le produit comme un polymère de structure non clairement définie accompagné de monomères libres de glucose, de sorbitol et d'anhydroglucose. Les analyses par MALD et ES nous permettent d'affirmer que ces monomères peuvent aussi être intégrés dans les polymères glucidiques au cours du processus de polycondensation car on les retrouve à chaque degré de polymérisation à raison d'un seul résidu de sorbitol (ou d'anhydroglucose) par oligosaccharide. D'autre part, la réaction de perméthylation appliquée aux polymères a augmenté l'incrément de masse entre les espèces et l'intensité des signaux ce qui a permis dans le cas notamment du polydextrose Pfizer A de mettre en évidence une famille minoritaire, celle des oligosaccharides comprenant un résidu d'anhydrosorbitol. Les résultats obtenus avec les deux techniques sont en parfait accord et se résument par la description d'une répartition glucidique constituée de deux familles pour le polyglucose Roquette I et de quatre familles pour le polydextrose Pfizer A. Le polyglucose Roquette I est constitué de la famille des homoglucooses et celle de leur anhydro correspondant. Le polydextrose Pfizer A est constitué des deux familles précédentes, de celle des alditols et de leur anhydro correspondant.

Les spectres se rapportant aux analyses ES et MALD du polydextrose Pfizer A natif et perméthylé montrent que l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  correspondant à la famille des alditols est apparemment la plus importante par rapport à la famille des homoglucooses.

Intensité relative



Intensité relative

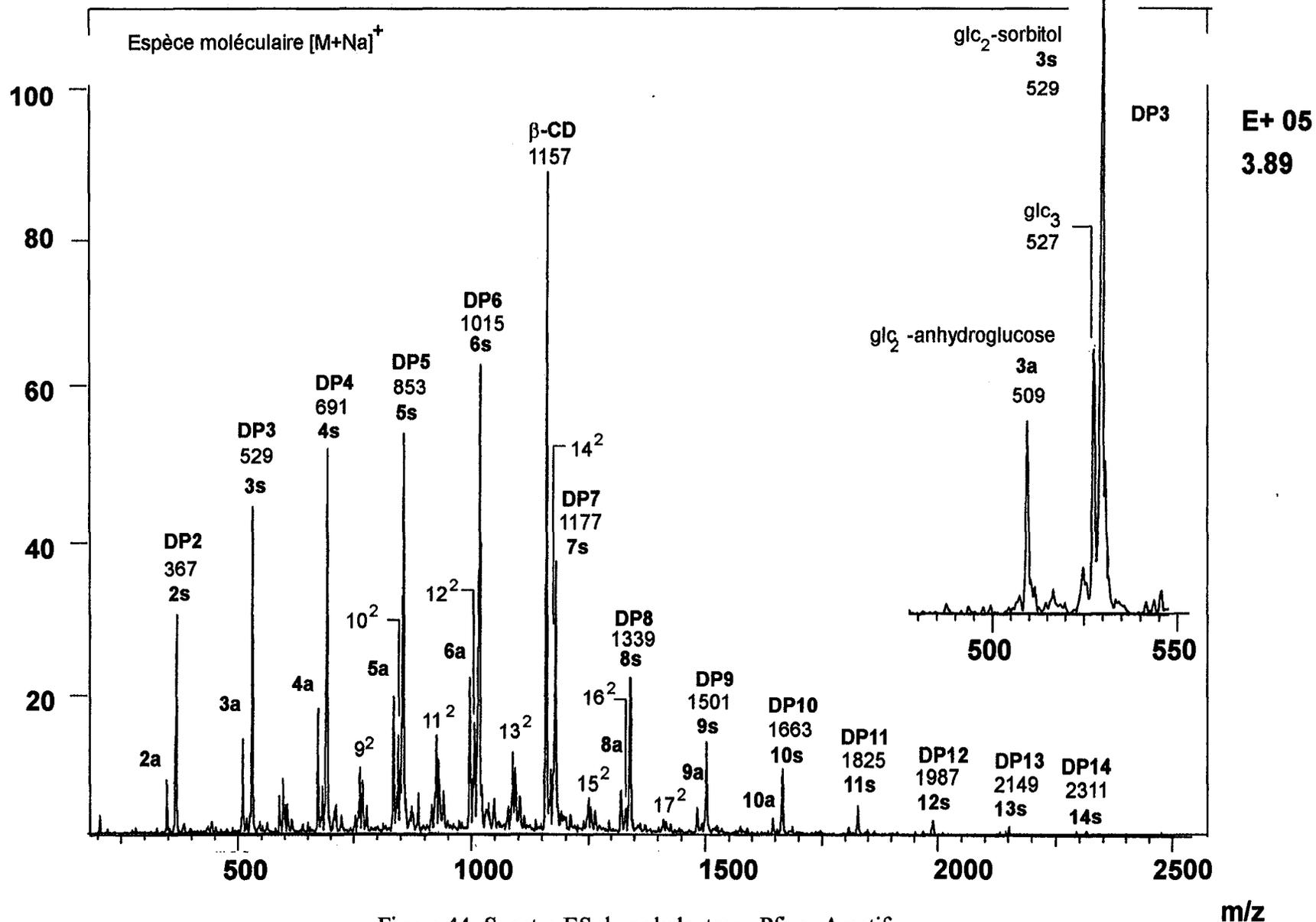


Figure 44: Spectre ES du polydextrose Pfizer A natif

**Intensité relative**

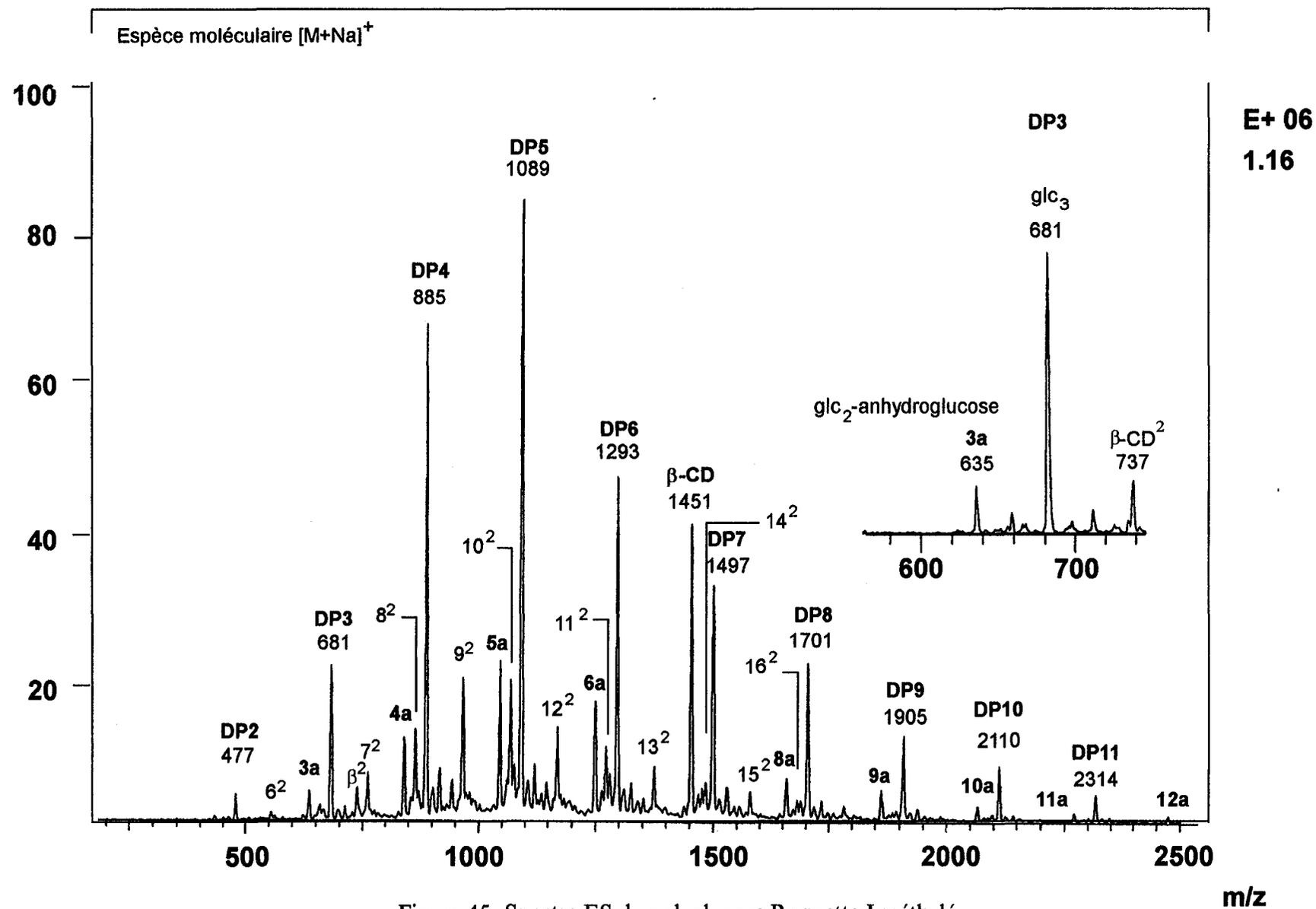
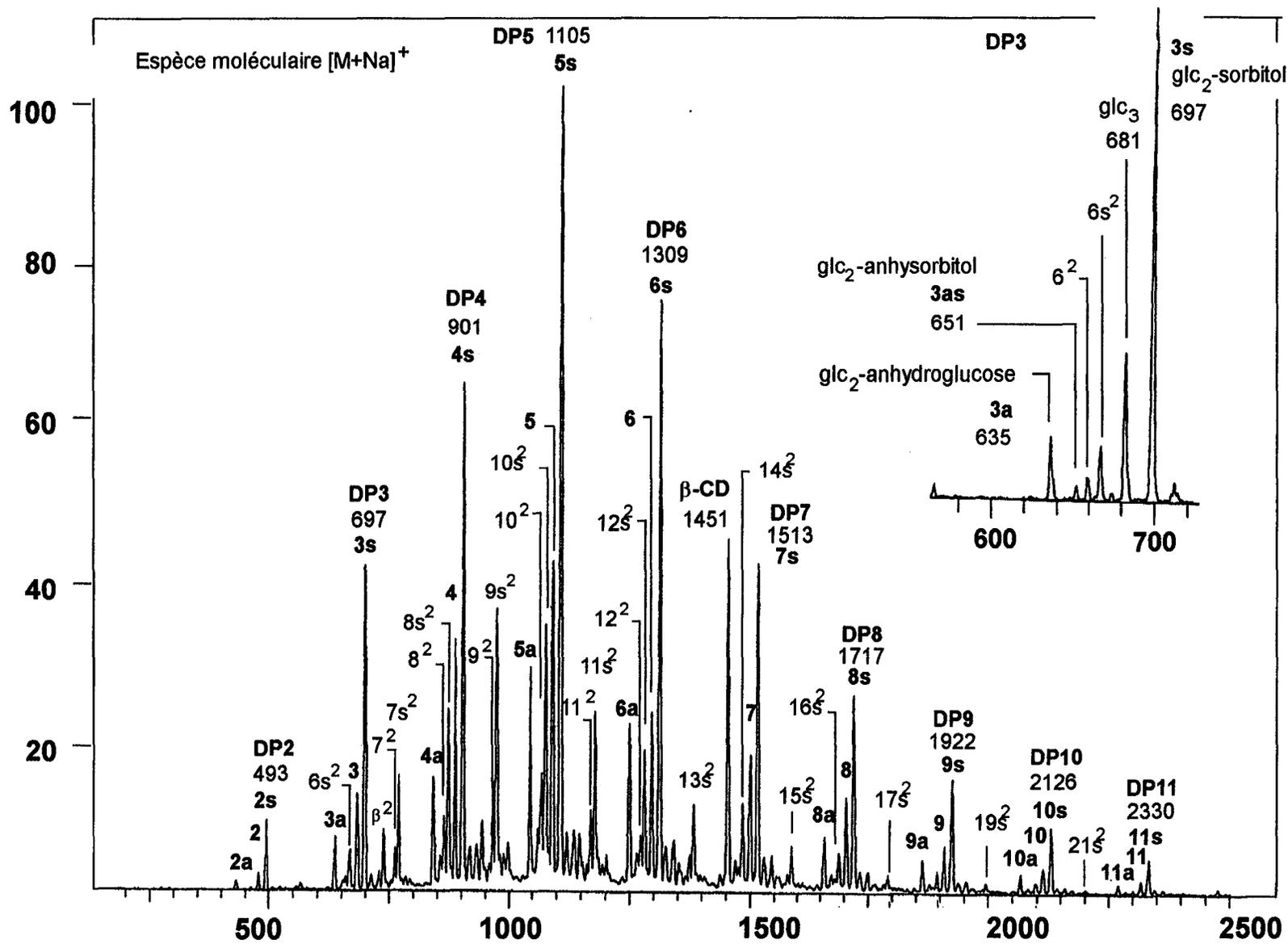


Figure 45: Spectre ES du polyglucose Roquette I méthyé

Intensité relative



E+ 06  
1.24

Figure 46: Spectre ES du polydextrose Pfizer méthylé

m/z

Comme nous l'avons démontré lors de l'analyse des maltooligosaccharides réduits, le coefficient de réponse des oligosaccharides réduits est supérieur à celui de leur homologue natif mais décroît en fonction de la longueur de l'oligosaccharide. Ces observations soulèvent la question de savoir si les spectres sont bien représentatifs du produit.

#### 4. 2. 2. Analyses semi-quantitatives par MALD et ES

Pour le second volet de la caractérisation des polymères glucidiques par spectrométrie de masse s'intéressant plus particulièrement à la détermination des paramètres de distribution glucidique, les analyses semi-quantitatives du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I ont été établies selon notre première expérience fondée sur les résultats obtenus avec les maltodextrines. Il est important de préciser que les conditions expérimentales optimales, déterminées dans un premier temps par MALD et par ES, ont été appliquées au polydextrose et au polyglucose afin de produire des spectres reproductibles et représentatifs des produits.

Concernant la mesure de la hauteur des pics en vue du calcul des valeurs de distribution glucidique, seules les intensités de pics attribuées aux homopolymères de glucose ont été retenues car chaque oligosaccharide appartenant aux familles contenant un résidu d'anhydroglucose, ou de sorbitol, ou d'anhydrosorbitol, possède un coefficient de réponse qui lui est propre et que nous n'avons pas pu déterminer de façon systématique. La  $\beta$ -cyclodextrine a été ajoutée aux polymères comme standard interne. Les calculs ont été réalisés sur les spectres présentés lors de l'analyse structurale par MALD et ES précédemment décrite.

#### Analyses par MALD

L'espèce moléculaire des constituants du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I est uniquement, comme pour les maltodextrines, l'espèce  $[M+Na]^+$ . La  $\beta$ -CD est présente sur les spectres à  $m/z$  1157 lorsque le standard interne est natif et à  $m/z$  1451 lorsqu'il est perméthylé (Figures 39, 40, 41 et 42).

#### Analyses par ES

Comme pour l'analyse des maltodextrines natives et méthylées, nous avons montré que les espèces moléculaires  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$  sont présentes sur les spectres ES et que l'intensité relative des dichargés augmente avec la taille de l'oligosaccharide. Nous avons observé les dichargés de la famille des homoglucooses à partir du degré de polymérisation 6 à  $m/z$  518 et les suivants à 599, 680, 761, 842 etc. pour les produits natifs et à  $m/z$  658 et les suivants à 760, 862, 964, 1066, etc. pour les produits perméthylés. La  $\beta$ -CD est présente sous

forme  $[M+Na]^+$  et  $[M+2Na]^{2+}$ . L'espèce  $[M+2Na]^{2+}$  se présente à  $m/z$  590 lorsqu'elle est native et à  $m/z$  737 lorsqu'elle est perméthylée (Figures 43, 44, 45 et 46).

Le Tableau 21 regroupe l'ensemble des valeurs de  $\overline{Mn}$ , de  $\overline{Mp}$ , de  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$  calculées à partir des spectres obtenus par les techniques de spectrométrie de masse, MALD et ES. Ces données sont une moyenne des résultats issus de trois analyses différentes. Les calculs concernant les produits perméthylés ont été convertis en équivalent homogluose natif afin de pouvoir comparer directement les valeurs de  $\overline{Mn}$ ,  $\overline{Mp}$ , de  $\overline{DP}$  et d'indice de polydispersité  $I$ .

La spectrométrie de masse en mode MALD et ES permet dans les conditions d'optimisation préalablement définies de produire des spectres de masse reproductibles. Comme nous le montre le Tableau 21, les deux techniques permettent d'obtenir des résultats du même ordre de grandeur pour les deux produits. Le degré de polymérisation moyen du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I déterminé par cette méthode est proche de 6.

Tableau 21: Caractérisation de la distribution glucidique du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I par spectrométrie de masse. Les calculs des paramètres de distribution ont été effectués uniquement sur les composés homogluoses. Pour les résultats concernant les analyses par ES, les calculs ont tenu compte de la somme des intensités relatives des espèces monochargées et dichargées.

	MALD		ES	
	Natif	Méthylé	Natif	Méthylé
<b>Roquette I</b>				
$\overline{Mn}$	925	1030	855	939
$\overline{Mp}$	1170	1475	986	1154
$\overline{DP}$	5,6	6,2	5,2	5,7
$I$	1,26	1,43	1,15	1,23
<b>Pfizer A</b>				
$\overline{Mn}$	965	1098	878	1062
$\overline{Mp}$	1321	1297	1032	1209
$\overline{DP}$	5,8	6,7	5,3	6,4
$I$	1,37	1,18	1,17	1,14

### 4. 3. Discussion

Les résultats issus des analyses de la répartition glucidique du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I par spectrométrie de masse en mode d'ionisation douce par MALD et par ES ont été comparés aux résultats obtenus avec les techniques plus classiques que sont la chromatographie de filtration sur gel, la résonance magnétique nucléaire et la cryométrie dans le Tableau 22. Les deux produits apparaissent relativement proches quelque soit la technique utilisée,  $\overline{Mn}$  estimé entre 900 et 1000,  $\overline{Mp}$  entre 1000 et 1400,  $\overline{DP}$  centré sur 5 et un indice de polydispersité  $I$  qui tend vers 2. La chromatographie de filtration sur gel démontre la présence de masses moléculaires élevées allant jusqu'à environ 11.000 pour le polydextrose Pfizer A et 16.000 Da pour le polyglucose Roquette. Comme pour les maltodextrines, la méthode de caractérisation par spectrométrie de masse basée sur une réponse quasi identique d'un mélange équimolaire d'une maltodextrine reconstituée avec des maltooligosaccharides commerciaux de DP2 à 7 est reproductible, fiable mais il lui manque pour l'instant une optimisation dans les hautes masses permettant de caractériser les polymères polydispersés. Les estimations proposées pour le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I doivent être pourtant entachées d'une erreur relativement faible car ces polymères ont un indice de polydispersité proche de 2, comme le Glucidex 33 qui a été la maltodextrine la mieux caractérisée par spectrométrie de masse. En effet, nous avons montré dans le Chapitre 1 que la caractérisation par MALD et ES d'échantillon polydispersés présentait certaines incertitudes, exprimées par une sur-estimation dans les basses masses moléculaires et une sous-estimation dans les plus hautes masses moléculaires par rapport à la technique de chromatographie de filtration sur gel. De plus, les DP1, 2 et 3 sont sous-estimés à cause de leur volatilité supérieure. Ce phénomène est encore amplifié sur les oligosaccharides méthylés. Les analyses effectuées sur le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I confirment de nouveau ces tendances car nous n'observons pas sur les spectres des masses moléculaires correspondant à des DP supérieurs à 25 comme nous aurions pu nous y attendre à la vue des résultats de chromatographie de filtration sur gel. La difficulté à estimer ces valeurs de paramètres glucidiques a été attribuée à une discrimination dans les hautes masses due entre autre à phénomène de suppression des hautes masses de polymères polydispersés par la technique MALD et par la suspicion d'un rendement d'ionisation dépendant de la taille des oligosaccharides par la technique ES. La technique MALD nous a tout de même permis d'observer des oligosaccharides de DP25 dans les polymères méthylés, passés inaperçus dans le produit natif. Ces résultats expriment toute la complexité d'analyses par spectrométrie de masse d'échantillons polydispersés et de leur interprétation.

D'autre part, les valeurs calculées lors de notre étude par spectrométrie de masse ont été exprimées en équivalent homogluucose comme dans le cas des maltodextrines et font une totale abstraction des autres composés décrits dans les produits (alditols, anhydroglucoses et

Tableau 22: Comparaison des valeurs de distribution glucidique du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I par spectrométrie de masse (MALD et ES) avec les techniques plus conventionnelles (chromatographie de gel filtration et cryométrie)

		Polyglucose Roquette I		Polydextrose Pfizer A	
		natif	méthylé	natif	méthylé
$\overline{Mn}$	<b>MALD</b>	925	1030	965	1098
	<b>ES</b>	855	939	878	1062
	<b>GPC</b>	830	-	710	-
$\overline{Mp}$	<b>MALD</b>	1170	1475	1321	1297
	<b>ES</b>	986	1154	1032	1209
	<b>GPC</b>	1660	-	1550	-
$\overline{DP}$	<b>MALD</b>	5,6	6,2	5,8	6,7
	<b>ES</b>	5,2	5,7	5,3	6,4
	<b>GPC</b>	5,0	-	4,3	-
	<b>Cryom.</b>	4,0	-	3,7 - 4,0	-
$I$	<b>MALD</b>	1,26	1,43	1,37	1,18
	<b>ES</b>	1,15	1,23	1,17	1,14
	<b>CPG</b>	2	-	2,2	-

anhydroalditols). Cette approximation est aussi une source d'erreur car nous ne connaissons pas la répartition glucidique de ces composés étant donné que les intensités relatives correspondantes sont affectées d'un coefficient de réponse méconnu et non déterminable pour chacun des composés. Cette estimation relative est pourtant couramment pratiquée et utilisée lors de l'expression des résultats obtenus par chromatographie de filtration sur gel et par cryométrie où dans ces cas les résultats sont exprimés en équivalent maltooligosaccharides ou pullulans. A propos de la chromatographie de filtration sur gel dont nous avons énoncé les limites dans le chapitre précédent, l'estimation des masses moléculaires moyennes, par cette technique, des produits de type polydextrose, peut être influencé par la présence de ramifications. En effet, comme nous le décrivons plus en détail dans le chapitre suivant, les polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I sont des polymères plus branchés que les maltodextrines.

Une analyse structurale de la composition des oligosaccharides constituant les polymères glucidiques a été menée en parallèle de l'analyse semi-quantitative car il nous a fallu déterminer la nature des composés pour intégrer uniquement les hauteurs de pics correspondant aux molécules d'homoglucoses. Cette approche structurale nous a apporté un certain nombre de renseignements. Les polydextroses sont des polymères glucidiques composés d'oligosaccharides homoglucoses issus de la polycondensation de glucose sur du glucose et d'oligosaccharides hétérogènes qui montrent l'intégration de résidus de sorbitol en particulier dans le polydextrose Pfizer A. Les deux produits possèdent des motifs issus de la déshydratation à chaud et en milieu acide des monomères de glucose et de sorbitol. En effet, le polyglucose Roquette I présente des oligosaccharides contenant des résidus d'anhydroglucose et le polydextrose Pfizer A des oligosaccharides contenant des résidus d'anhydroglucose et d'anhydrosorbitol. L'incrément de masse entre les constituants d'une même famille de produits correspond à un résidu de glucose et cet écart de masse est semblable pour les quatre familles décrites. Ces familles présentent donc la particularité de ne posséder, en majorité tout du moins, qu'un seul résidu de sorbitol, d'anhydroglucose ou d'anhydrosorbitol, par oligosaccharide. Lors de la fabrication des polymères, la condensation des monomères, décrite jusqu'alors comme totalement aléatoire, semble alors suivre une certaine logique influencée par des facteurs tels que le nombre de résidus de sorbitol présent lors de la mise en oeuvre, la quantité d'anhydroglucose et d'anhydrosorbitol produite au cours de la réaction de condensation, l'environnement stérique des oligosaccharides formés et les propriétés chimiques des monomères en présence, notamment la réactivité des différentes fonctions chimiques des monomères.

La présence des oligosaccharides alditols est fortement marquée sur les spectres ES et MALD du polydextrose Pfizer A natif et méthylé. Etant donné, les proportions de mise en oeuvre du produit, glucose/sorbitol/acide citrique (89/10/1), et l'expérience effectuée sur les oligosaccharides réduits qui a montrée une décroissance du coefficient de réponse en fonction

de l'augmentation de la masse de l'alditol, nous nous sommes posés la question de savoir si les spectres étaient bien représentatifs du polydextrose Pfizer A. Afin de comprendre la répartition statistique des monomères, nous avons calculé selon un modèle de 10 oligosaccharides de  $\overline{DP}$  égal à 5 que nous avons donc 50 résidus dont 5,6 sont du sorbitol. Sur la base d'un sorbitol par oligosaccharide alditol, comme cela a été démontré sur les spectres ES et MALD, nous obtenons 5,6 oligosaccharides alditols et 4,4 oligosaccharides réducteurs soit statistiquement 56% d'oligosaccharides alditols et 44% d'homoglucoses. Lorsque ce même calcul est effectué sur une population de 10 oligosaccharides de  $\overline{DP}$  égal à 7, nous obtenons 78% oligosaccharides alditols et 22% d'oligosaccharides réducteurs. Il n'est pas facile de se faire une idée précise sur les spectres montrés, car ils sont présentés en mode profile et nous réalisons malgré tout une erreur en prenant les hauteurs des pics au lieu de l'intégrale. Cependant, à la vue de l'allure des pics observés et du rapport oligosaccharides alditols/réducteurs, le  $\overline{DP}$  doit être supérieur à 5 et probablement inférieur à 7. Ces modèles montrent que lorsque les oligosaccharides augmentent de taille moyenne, la proportion des alditols augmente aussi. Nous faisons abstraction des anhydroglucoses et des anhydrosorbitols car nous ne connaissons pas leur proportions respectives. La dominance des alditols par rapport aux homoglucoses est alors justifiée par un  $\overline{DP}$  du polymère environ égal à 6 et les spectres de masse du polydextrose Pfizer A semblent assez représentatifs du produit.

#### 4. 4. Conclusion

La caractérisation des polymères glucidiques de type polydextrose a été abordée en première approche par différentes techniques, la chromatographie de filtration sur gel, la résonance magnétique nucléaire et la cryométrie afin de déterminer les paramètres de répartition glucidique en masses moléculaires moyennes  $\overline{Mn}$  et  $\overline{Mp}$ , le degré de polymérisation moyen  $\overline{DP}$  et l'indice de polydispersité  $I$ . L'enjeu de l'approche par spectrométrie de masse a été de mener en parallèle une analyse qualitative c'est-à-dire une analyse structurale des oligosaccharides composant les polymères et une analyse semi-quantitative donnant les valeurs de distribution glucidique.

Les techniques de chromatographie de filtration sur gel et de cryométrie nous ont permis d'exprimer la répartition glucidique notamment en terme de degré de polymérisation moyen ( $\overline{DP}$ ). Le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I ont donné tout deux un degré de polymérisation l'ordre de 4, 5. La résonance magnétique nucléaire adéquate pour l'estimation du degré de polymérisation moyen de maltodextrines n'a pourtant pas pu être appliquée aux polydextroses étant donné l'hétérogénéité de structure qui a été mise en

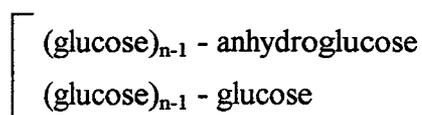
évidence sur les spectres présentant des massifs non résolus et la présence d'oligosaccharides réducteurs et non réducteurs dans le cas du polydextrose Pfizer A. Cette technique a pourtant démontré la présence de monomères libres d'anhydroglucose sous formes pyranique et furanique ainsi que l'existence de liaisons  $\alpha(1-6)$  et  $\alpha(1-4)$  glycosidiques. Les liaisons  $\alpha(1-6)$  sont les plus représentées dans les deux produits.

Les techniques de spectrométrie de masse, MALD et ES, appliquées à la caractérisation des polymères glucidiques complexes nous ont apporté des renseignements complémentaires.

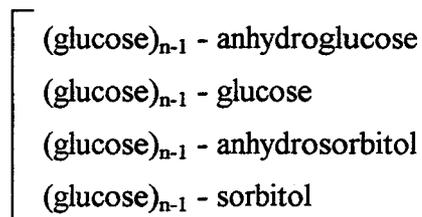
L'analyse qualitative a décrit des éléments de structure dont la répartition en familles de produit. Alors que les maltodextrines Glucidex se présentent comme des homopolymères de glucose issus de l'hydrolyse de l'amidon, ces analyses démontrent que la réaction de polycondensation se réalise par polymérisation des molécules de glucose entre elles et incorporation des molécules de sorbitol pour le polydextrose Pfizer A. Par ailleurs, la déshydratation des monomères de glucose et de sorbitol, en milieu acide et à chaud, produit des résidus d'anhydroglucose et d'anhydrosorbitol intégrés dans les oligosaccharides lors de la condensation. La répartition glucidique des produits de polycondensation obtenue par ES et MALD démontre l'incorporation d'un seul résidu de sorbitol, d'anhydroglucose ou d'anhydrosorbitol par oligosaccharide.

La constitution des oligosaccharides correspondant à un degré de polymérisation  $n$  est la suivante:

**Polyglucose. Roquette I:**



**Polydextrose Pfizer A:**



L'analyse semi-quantitative confirme la tendance observée lors de l'étude préliminaires des maltodextrines en montrant des résultats sur-estimés dans les basses masses moléculaires et sous-estimés dans les hautes masses moléculaires par rapport aux résultats obtenus par chromatographie de filtration sur gel. Aux questions soulevées lors de l'analyse des maltodextrines (rendement d'ionisation dépendant de la taille des oligosaccharides par ES, existence d'un phénomène de suppression des hautes masses moléculaires dans un échantillon polydispersé par MALD), s'ajoutent celles résultant de la complexité structurale des polydextroses. Alors que les autres techniques ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité de structure apportée par les alditols et les anhydrosucres et considèrent les polydextroses comme des homopolymères de glucose, la spectrométrie de masse possède une résolution suffisante pour individualiser chaque composé et permettre une approche quantitative par

intégration spécifique. Lors de la détermination des masses moléculaires moyennes des polymères, nous avons intégré uniquement les homoglucooses et fait une abstraction volontaire des autres composés car la participation de l'ensemble des constituants nécessiterait la détermination de chacun des coefficients de réponse afin de corriger les intensités relatives observées. De même, au sein d'un degré de polymérisation donné, l'intensité relative au composé homoglucoose est en fait la somme des intensités relatives de plusieurs homoglucooses de masse moléculaire identique mais de structures différentes. Chacune de ces structures possède son propre coefficient de réponse que nous verrons être impossible à déterminer de façon systématique étant donné l'hétérogénéité structurale mise en évidence dans le chapitre suivant. Par ailleurs, les spectres ES et MALD du polydextrose Pfizer A natif et méthylé montrent la dominance des oligosaccharides à sorbitol. Du fait que chaque alditol ne possède qu'un seul résidu de sorbitol, la proportion des oligosaccharides alditols par rapport aux homoglucooses calculée selon un modèle statistique correspondrait à un  $\overline{DP}$  compris entre 5 et 6, c'est-à-dire à environ 67% d'oligosaccharides réducteurs pour 33% d'oligosaccharides alditols. Ces pourcentages ne tiennent pas compte des anhydrosucres dont on ne connaît pas la proportion. Ce rapport homoglucoose/alditols ainsi avancé est confirmé par l'image MALD et ES du produit qui semble alors assez représentative du polymère. Ce résultat suggère que l'importance des coefficients de réponse doit être somme toute négligeable mis à part pour les monomères et les plus bas DP.

La spectrométrie de masse nous a permis de montrer que le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I sont assez similaires en terme de répartition glucidique avec un degré de polymérisation proche de 6 et assez semblables en terme de structure car produits par réaction de polycondensation en milieu acide et à chaud dans des conditions voisines. Les composés mis en évidence sont des homopolymères de glucose et des oligosaccharides plus hétérogènes qui incluent le sorbitol et des produits de déshydratation comme l'anhydroglucose et l'anhydrosorbitol. Ces analyses ont apporté des éléments de réponse pour la caractérisation des polymères glucidiques mais soulèvent aussi un bon nombre de questions. Les analyses MALD et ES donnent effectivement la masse moléculaire des différents composés mais ne permettent pas de connaître la structure précise des molécules comme la position des motifs (anhydroglucose, sorbitol et anhydrosorbitol), le (ou les) type(s) de liaison, la position des ponts anhydro. Ces questions sont celles que nous allons tenter d'élucider dans le chapitre suivant.

---

## **Chapitre 5**

### **Résultats et Discussion**

---

## CHAPITRE 5. Analyse structurale des polymères glucidiques

Le but de ce présent chapitre a été de réaliser une analyse structurale des constituants des polymères glucidiques de type polydextrose et polyglucose. Cette caractérisation structurale consiste en la détermination, des monomères constitutifs des oligomères, du (ou des) type(s) de liaisons, de la position des liaisons, de l'anomérisation et de la forme du cycle.

L'étude a été réalisée sur les produits Pfizer et Roquette bruts ou fractionnés selon différentes techniques.

### 5. 1. Etudes préliminaires

La première partie de l'analyse structurale des polydextroses a été initialisée par une détermination de la composition chimique des polymères glucidiques issus de polycondensation. Ces analyses sont destinées à vérifier la conformité du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I aux normes en vigueur. En effet, les produits destinés à la consommation sont soumis à une législation stricte et les spécifications concernant le polydextrosé sont décrites dans le Food Chemical Codex dont la dernière édition date de mars 1996. Les analyses spectroscopiques par résonance magnétique nucléaire et infrarouge permettent une caractérisation plus globale des produits avant leur étude structurale plus détaillée par spectrométrie de masse.

#### 5. 1. 1. Composition chimique et normes du Food Chemical Codex

Le Food Chemical Codex présente les exigences appliquées en deux séries d'analyses. Des tests d'identification (réaction au phénol sulfurique, précipitations à l'acétone par 1 volume et 3 volumes et la mise en évidence des sucres réducteurs) visant à confirmer la nature saccharidique du produit et une série d'essais comprenant le dosage des composés en présence : glucose, sorbitol, anhydroglucoses, acide citrique, eau résiduelle, métaux lourds et 5-hydroxyméthyl-2-furfural. L'appareillage ainsi que les protocoles à utiliser sont spécifiés pour chaque analyse. Un tableau récapitulatif a été présenté dans le chapitre Généralités.

## Tests d'identification

Le Tableau 23 ci-dessous résume les quatre tests d'identification d'un polydextrose dont une réaction au phénol sulfurique, une précipitation fractionnée à l'acétone et la réaction de Fehling. La mise en évidence des oses neutres par la méthode au phénol sulfurique repose sur le principe selon lequel l'ose se transforme en un dérivé du furfural dans une solution concentrée d'acide sulfurique et à chaud. Le dérivé du furfural par condensation avec le phénol forme un composé coloré jaune - orange. Le test A démontre donc la présence de substrats de nature saccharidique. Les tests B et C utilisent la précipitation des molécules de nature saccharidique par l'acétone. La liqueur de Fehling décrite dans le test D est composée d'un hydroxyde cuivrique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) maintenu en solution par le tartrate de sodium et de potassium avec lequel il forme un complexe. La fonction réductrice des oses a la propriété de réduire ce cuivre bivalent en cuivre monovalent qui précipite à l'état d'oxyde cuivreux ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) de couleur rouge brique. Le résultat du test démontre la présence de molécules réductrices dans les produits.

Les résultats des tests d'identification permettent de conclure sur la nature saccharidique du polydextrose Pfizer A et polyglucose Roquette I se présentant sous forme de répartition oligomérique et renfermant des fonctions réductrices. Ces tests ne permettent pas de mettre en évidence de différence entre les deux produits. Le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I sont conformes aux tests d'identification du polydextrose décrits par le Food Chemical Codex.

Tableau 23: Tests d'identification d'un polydextrose (normes FCC)

Test	Réactif	Critère identifié	Pfizer A	Roquette I
Test A	Phénol sulfurique	Nature saccharidique	Coloration jaune - orange	
Test B	Acétone (1 volume)	Répartition oligomérique	Solution claire	
Test C	Acétone (3 volumes)	Répartition oligomérique	Solution laiteuse	
Test D	Liqueur de Fehling	Sucres réducteurs	Surnageant bleu - Précipité rouge	

## Composition chimique

Les essais décrits dans le FCC permettent de doser la matière sèche, la matière minérale, les divers composés glucidiques (glucose, sorbitol et anhydroglucoses) et leurs dérivés (5-

hydroxyméthyl-2-furfural), l'acide citrique et les métaux lourds. Pour le polydextrose Pfizer A, ces dosages mettent en évidence la présence de molécules résiduelles issues de la mise en oeuvre comme du glucose, du sorbitol et de l'acide citrique. La différence entre le sorbitol libre et le sorbitol total après hydrolyse, confirme l'intégration d'environ 85 % du sorbitol mis en oeuvre dans le polymère glucidique. De même pour le catalyseur, les résultats montrent une incorporation d'environ la moitié de la quantité initiale dans le polymère mais la présence d'acide citrique libre reste néanmoins sous forme de traces. La libération de l'acide citrique lié au polymère glucidique est réalisée par saponification car la littérature décrit une réticulation transversale par estérification du catalyseur. Par contre pour le polyglucose Roquette I, le sorbitol et l'acide citrique n'apparaissent pas car ils ne sont pas présents dans le processus de fabrication du produit. Le polyglucose Roquette II obtenu par traitement du polyglucose Roquette I renferme un faible pourcentage de sorbitol car l'enzyme, la glucose oxydase, est stabilisée par ce monomère. Le point commun aux deux produits est la présence de produits de dégradation du glucose en milieu acide et à chaud que sont les monomères de 1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucoses sous formes pyranique et furanique et le 5-hydroxyméthyl-2-furfural. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 24 et montrent que les deux produits sont effectivement conformes aux normes FCC.

### 5. 1. 2. Infrarouge et Résonance magnétique nucléaire

Ces analyses ont été réalisées dans le but d'appréhender l'étude structurale des produits d'une façon globale mais aussi afin de produire une "empreinte" des produits à des fins de comparaison au sein d'une gamme de produits donnés.

#### Infrarouge

La spectroscopie infrarouge de polymères complexes de type polydextrose ne peut apporter que des renseignements très généraux étant donné que ces produits ne correspondent pas à une entité moléculaire précise mais à un mélange de structures différentes comme nous l'avons vu lors de la détermination de la composition chimique et par spectrométrie de masse. Elle permet pourtant de mettre en évidence des groupements fonctionnels particuliers et d'obtenir une empreinte du produit.

Tableau 24: Compositions chimiques et normes FCC du Polydextrose

<b>Critère</b>	<b>Polydextrose Pfizer A</b>	<b>Polyglucose Roquette II</b>	<b>Normes FCC</b>
<b>Matière sèche % p/p brut</b>	98,8	97,7	> 96
<b>Matières minérales % p/p sec</b>	< 0,1	< 0,1	< 0,3
<b>Sucres réducteurs % p/p sec</b>	6,9	15,4	
<b>Glucose total % p/p sec</b>	89,7	102	
<b>Glucose libre % p/p sec</b>	2,8	0,8	glucose + sorbitol
<b>Sorbitol libre % p/p sec</b>	1,6	0,4 *	libres < 6,0
<b>Sorbitol total % p/p sec</b>	10,6	0,4	
<b>Acide citrique libre % p/p sec</b>	0,6	non déterminé	
<b>Acide citrique total % p/p sec</b>	1	non déterminé	
<b>1,6 anhydro-β-D- glucopyranose % p/p sec</b>	1,2	0,9	< 4,0
<b>1,6 anhydro-β-D- glucofuranose % p/p sec</b>	1,2	0,7	
<b>5-hydroxyméthyl furfural ppm</b>	non vérifié	2,7	< 1000
<b>Métaux lourds totaux mg/kg</b>	non vérifié	< 5	< 5

\* le sorbitol vient du procédé industriel (traitement à la glucose oxydase)

Les tracés des spectres infrarouge correspondant au polydextrose Pfizer A et polyglucose Roquette I sont présentés dans la Figure 47 et montrent des profils assez semblables. Ils se différencient pourtant par la présence dans le spectre du Pfizer A d'une bande entre 1700 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de la double liaison carbone-oxygène apportée par la fonction carbonylée de l'acide citrique.

### RMN du proton

La résonance magnétique nucléaire de polymères glucidiques produit des spectres plus riches en informations que ceux issus de la spectroscopie infrarouge. La RMN a la capacité de renseigner notamment sur la nature des monomères, de la forme des cycles (pyrane ou furane), les liaisons osidiques et leur anomérie. Les spectres présentés dans la Figure 48 montrent respectivement le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I. Ils ont déjà été succinctement détaillés au cours du chapitre précédent. Les spectres des deux produits ont une allure générale assez proche. Le polydextrose Pfizer A montre la présence attendue du catalyseur, l'acide citrique libre, sous forme d'un quadruplet entre 2,6 et 3 ppm. Les deux spectres mettent en évidence la présence des monomères de 1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucose pyranique ( $H_1$  à 5,45 ppm) et furanique ( $H_1$  à 5,10 ppm), par comparaison avec les spectres des molécules témoins. La présence de ces deux formes d'anhydroglucose semble être plus importante pour le polydextrose Pfizer A. Cette observation confirme le dosage des monomères libres fait précédemment. Les signaux  $H_1$  à 5,42 ppm et 5,00 ppm correspondent respectivement au proton  $H_1$  des liaisons glucosidiques  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-6)$ . Le signal à 5,00 ppm présent sur les deux spectres montre la prédominance des liaisons de type  $\alpha(1-6)$  entre deux résidus de glucose dans les produits avec une proportion relative plus importante pour le polyglucose Roquette I. Le reste des spectres se trouve sous forme de plusieurs massifs non résolus, difficilement interprétables, et démontrant une structure relativement hétérogène.

Les tests d'identification décrits par le Food Chemical Codex ont permis de confirmer la nature saccharidique des polymères glucidiques présents sous forme de répartition glucidique. Concernant la composition chimique des polymères, des dosages spécifiques nous ont montré une particularité du polydextrose Pfizer A d'intégrer dans sa structure des monomères de sorbitol et des résidus d'acide citrique estimés par différence entre les motifs libres et totaux.

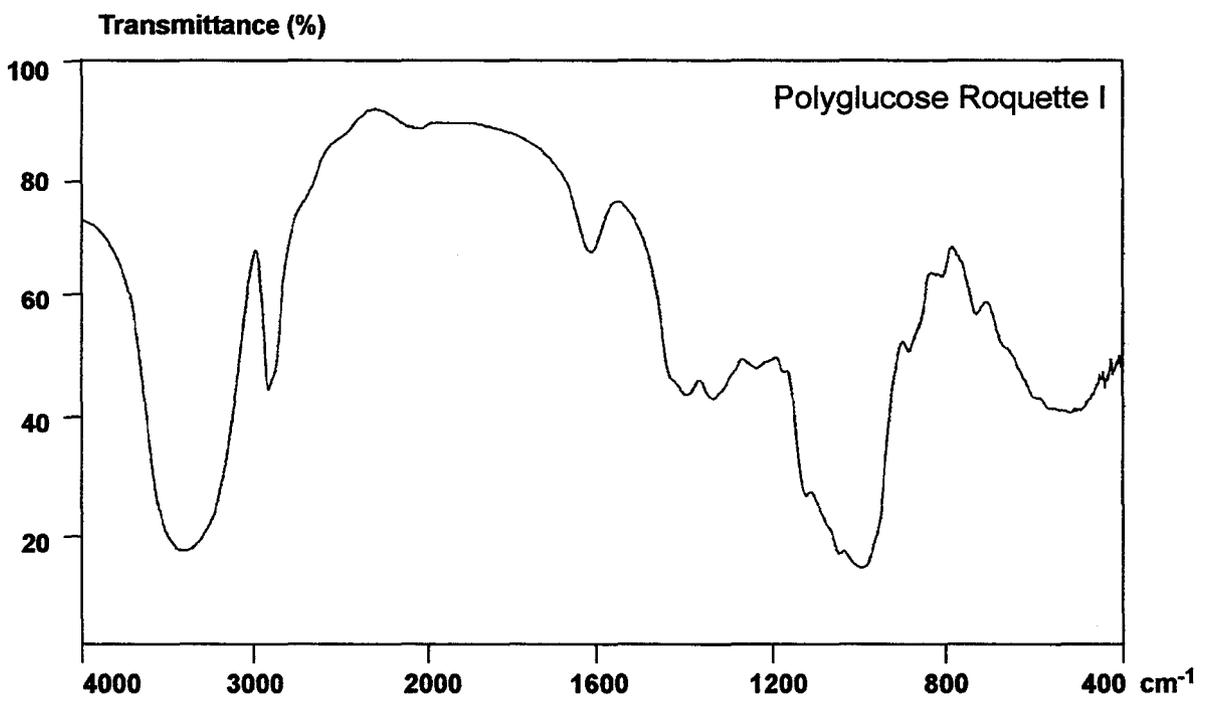
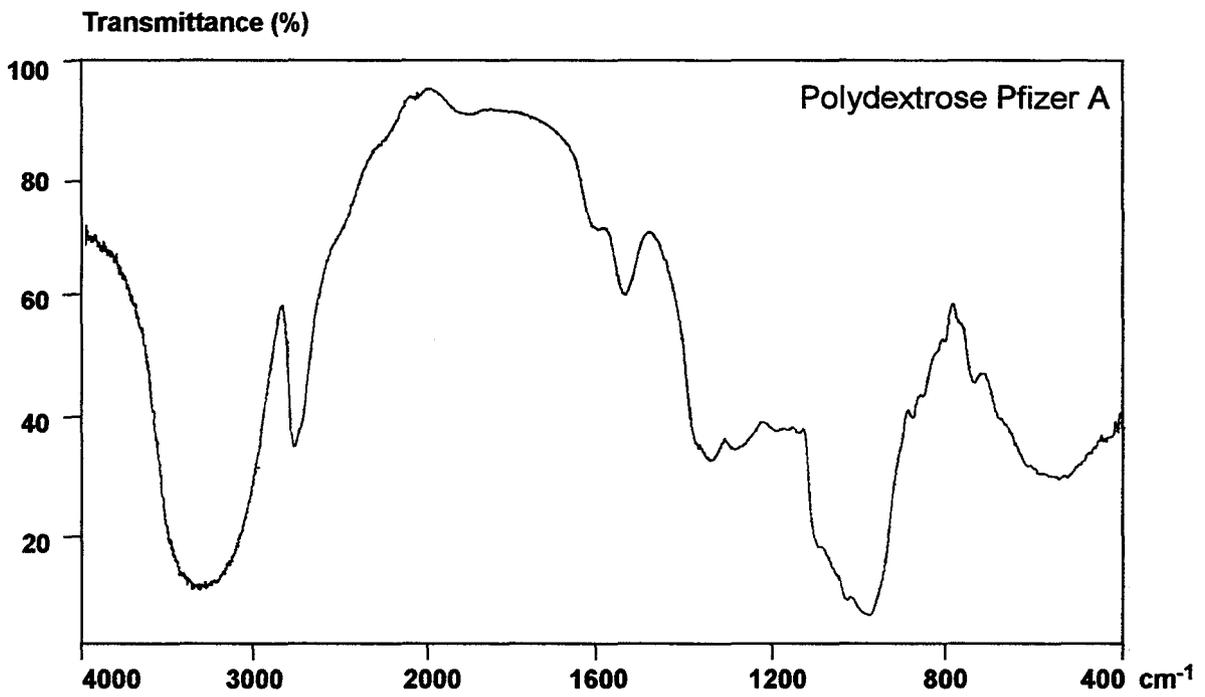


Figure 47: Spectres infrarouge du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I

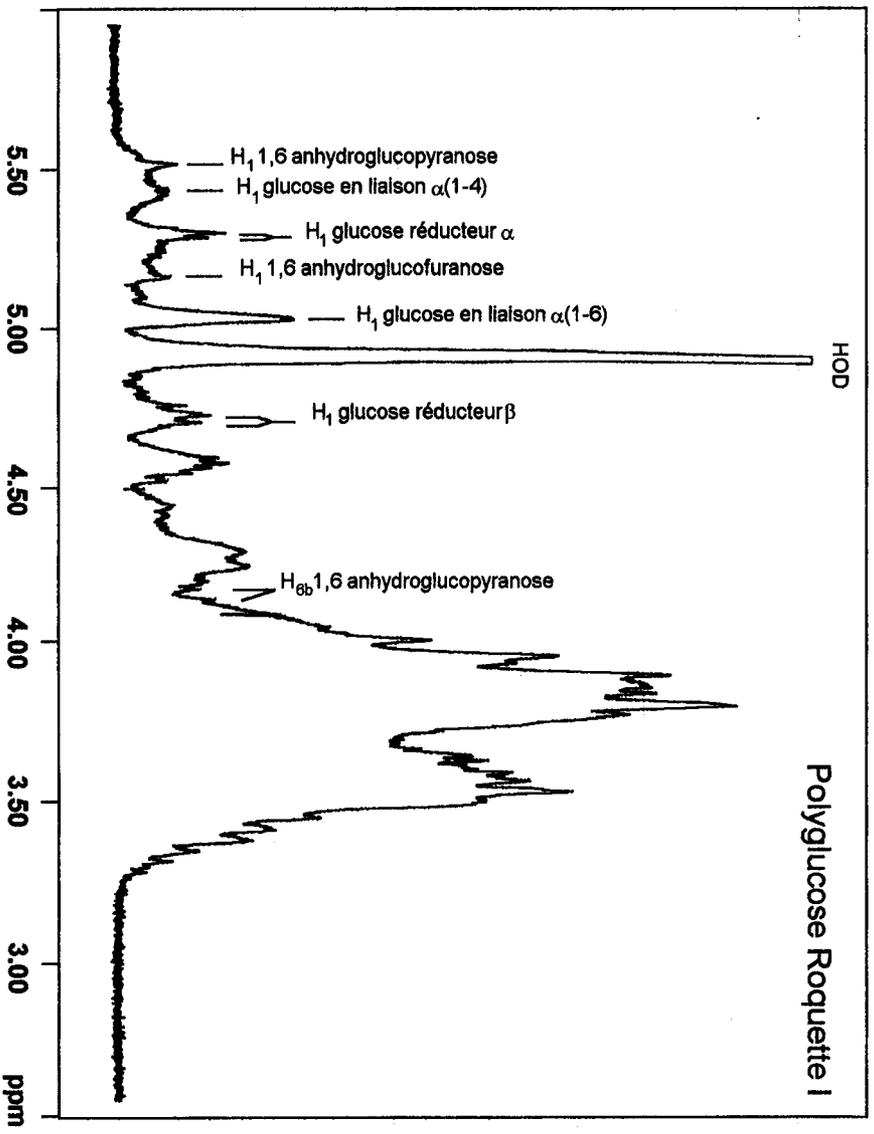
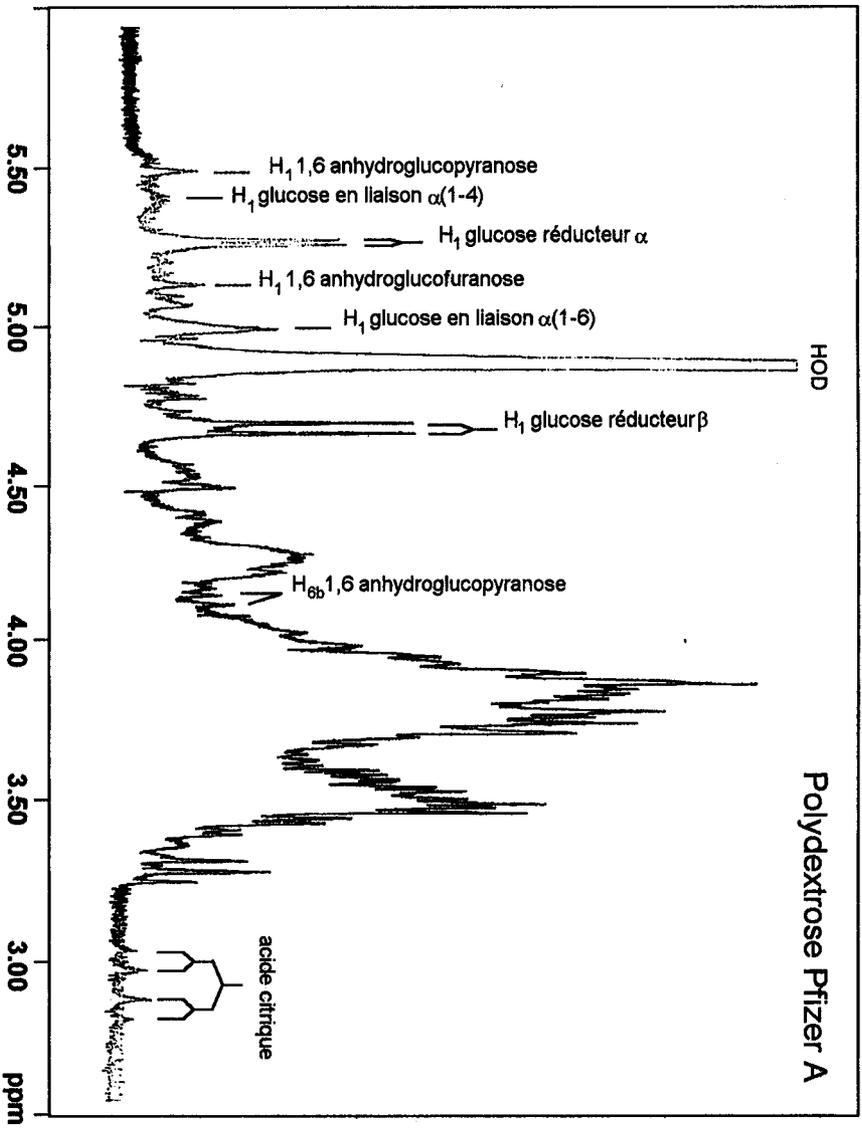


Figure 48: Spectres RMN du proton du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I

La présence d'anhydroglucose et de 5-hydroxyméthyl-2-furfural démontre la dégradation de résidus de glucose en milieu acide et à chaud. Les techniques de spectroscopie infrarouge et de résonance magnétique nucléaire permettent d'apporter d'autres renseignements structuraux. Les spectres infrarouge renseignent certes peu mais mettent en évidence des groupements fonctionnels comme la fonction hydroxyle commune aux résidus de glucose, de sorbitol et de 1,6 anhydroglucose et la fonction carboxylique présente dans la molécule d'acide citrique. La résonance magnétique nucléaire confirme la présence des résidus précédemment cités mais démontre surtout une très grande hétérogénéité de structure, due en particulier aux différents types de liaisons glycosidiques et la présence des anoméries  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette technique a mis en évidence la présence prédominante des liaisons  $\alpha(1-6)$ . Ces deux techniques produisent avant tout des spectres représentant des " empreintes " des produits qui sont utilisées en routine par la société Roquette pour comparer différents polymères glucidiques ou différents lots d'un même polymère lors d'un suivi de production.

## 5. 2. Analyse structurale par spectrométrie de masse

Alors que la spectrométrie de masse, par MALD et ES, appliquée aux polymères a permis de caractériser les répartitions glucidiques du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I, les différents dosages et les méthodes physico-chimiques ont montré l'hétérogénéité des produits issus de polycondensation. Le but de ce présent chapitre est l'analyse structurale détaillée de ces produits. Elle a demandé plusieurs étapes complémentaires. Une constitution globale des monomères et la détermination de leurs points de substitution par chromatographie en phase gazeuse (GC), une estimation du degré de ramification et la mise en évidence de produits de dégradation des sucres par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) ont constitué une première approche. A la vue des résultats, il s'est avéré nécessaire d'appliquer une seconde stratégie basée sur le fractionnement des produits et sur l'analyse structurale détaillée des fractions ainsi obtenues.

### 5. 2. 1. Analyse structurale globale

#### Composition en monosaccharides par phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés

Cette technique, couramment utilisée en première analyse lors d'études de glycannes, permet d'établir la composition en monosaccharides et les rapports molaires correspondants. Les polymères glucidiques ont été méthanolysés et les monosaccharides libérés sont dérivés par triméthylsilylation afin d'être rendus volatiles pour leur analyse par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatogramme de la Figure 49 montre quatre pics pour le polydextrose. Le mésoinositol, standard interne élué à 46,92 min, permet de vérifier le bon déroulement du protocole opératoire. Pour les autres pics, l'attribution s'effectue en comparant les temps de rétention avec des standards et la valeur du rapport des intensités de pics entre les différents anomères. Les pics à 32,98 et 34,15 minutes correspondent respectivement à l' $\alpha$ -(D)glucopyranose et au  $\beta$ -(D)glucopyranose et le rapport entre les deux pics est de l'ordre de 3. Le pic élué à 37,02 minutes représente le sorbitol triméthylsilylé.

Une confirmation de cette analyse a été effectuée par l'analyse de ces dérivés triméthylsilylés par couplage GC/MS en mode d'ionisation chimique. Le gaz réactant utilisé est l'ammoniac. Les spectres correspondant aux composés précédemment décrits montrent l'espèce moléculaire  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  553 correspondant au glucose triméthylsilylé pour les deux premiers pics et  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  625 pour le sorbitol triméthylsilylé.

Les analyses des dérivés persilylés obtenus à partir du polydextrose Pfizer A par GC et par GC/MS en mode d'ionisation chimique démontrent donc la présence des monomères de glucose et de sorbitol. Cette analyse appliquée au polyglucose Roquette I démontre qu'il est quant-à-lui constitué uniquement de résidu de glucose.

Les molécules d'anhydroglucose et d'anhydrosorbitol mises en évidence dans le Chapitre 1 des Résultats n'apparaissent pas lors de ces analyses car la liaison acétalique interne n'est pas stable lors de la méthanolyse et les composés régénérés sont respectivement du glucose et du sorbitol. L'instabilité de l'anhydroglucose vis-à-vis de la méthanolyse a été vérifiée par traitement du témoin anhydro-1,6-(D)glucopyranose et par l'analyse des produits formés triméthylsilylés par GC/MS en mode d'ionisation chimique comme précédemment.

La détermination du coefficient de réponse du sorbitol (0,93) par rapport à celui du glucose (1) a permis de calculer le rapport molaire entre les deux composés soit 9 résidus de

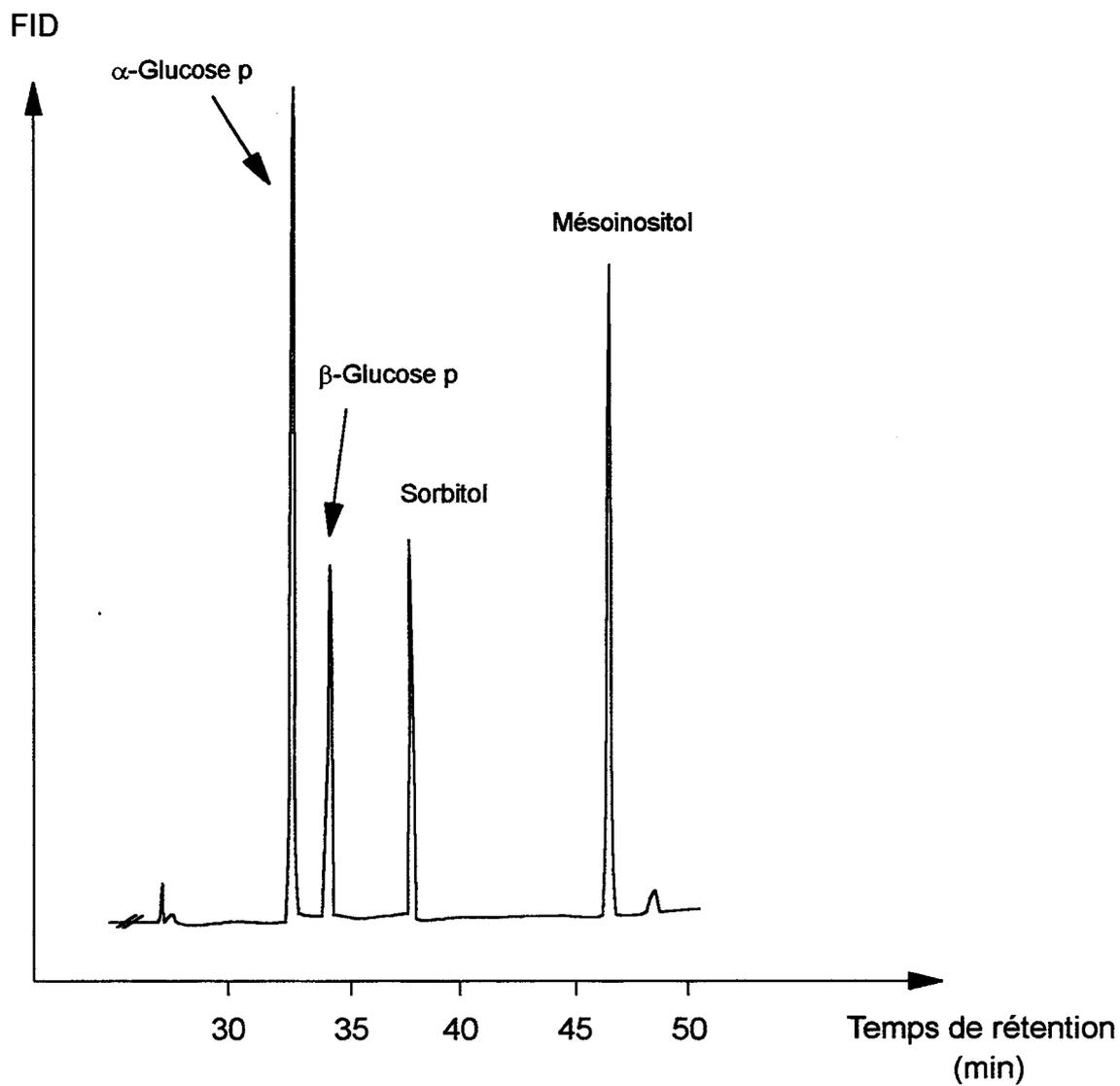


Figure 49: Chromatogramme en phase gazeuse des monosaccharides triméthylsilylés résultant de la méthanolyse du polydextrose Pfizer A  
Programme de température 120-240°C à 2°C par minute

glucoses pour 1 résidu de sorbitol. Ce résultat prévisible représente le rapport entre les composés lors de la réaction conduisant à la fabrication du polydextrose Pfizer A.

### Mise en évidence du 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde et de l'acide lévulinique

La dégradation issue de l'hydrolyse en milieu acide et à chaud de sucres est communément regroupée sous le terme de réactions de brunissement non enzymatiques. Le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (HMF) est le principal produit issu de la dégradation du glucose ou du fructose. L'hydratation du HMF entraîne la formation d'acide formique et d'acide lévulinique. La polymérisation de ses dérivés produit des substances complexes de hautes masses moléculaires appelées les humines dont on ne connaît à l'heure actuelle que quelques éléments de structure, en particulier leurs teneurs élevées en carbone et hydrogène obtenues lors de l'étude de leur composition élémentaire. Les mécanismes réactionnels conduisant au HMF, à l'acide formique, à l'acide lévulinique et aux autres molécules qui apparaissent lors de l'hydrolyse acide de sucres sont extrêmement compliqués et ne sont que partiellement élucidés (van Dam *et al.*, 1986).

Nous avons vérifié lors de l'étude de la composition chimique que le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I contiennent effectivement le monomère de HMF en faibles quantités. Le but de ce paragraphe a été de mettre en évidence la présence éventuelle de produits issus de la condensation de résidus intacts de glucose ou de sorbitol avec des produits de dégradation comme le HMF et l'acide lévulinique.

Comme les monomères de HMF et d'acide lévulinique sont présents en très faibles quantités, les composés recherchés doivent l'être aussi comparés au polymère glucidique lui-même. La première étape de notre travail a consisté à synthétiser ces molécules en assez grande quantité afin de les caractériser par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et par ES. Pour se faire, des milieux réactionnels synthétiques comprenant, du glucose ou du sorbitol, du HMF ou de l'acide lévulinique et de l'acide citrique ou de l'acide sulfurique, dans les proportions de fabrication de polydextrose ont été chauffés à 60°C. Une partie de chaque échantillon a été triméthylsilylée et analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique (NH<sub>3</sub>) alors qu'une autre partie a été analysée par électrospray. Ces expérimentations ont servi à démontrer l'existence des réactions de condensation entre un

aldose (glucose) ou un alditol (sorbitol) et un produit de dégradation du glucose (HMF ou l'acide lévulinique).

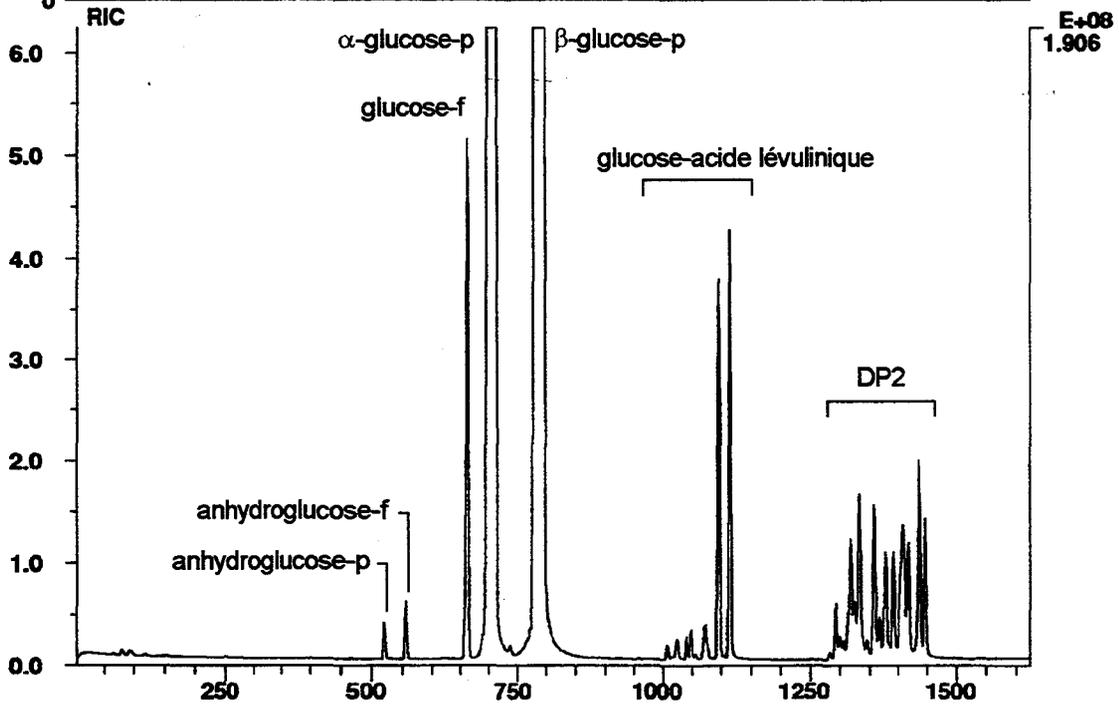
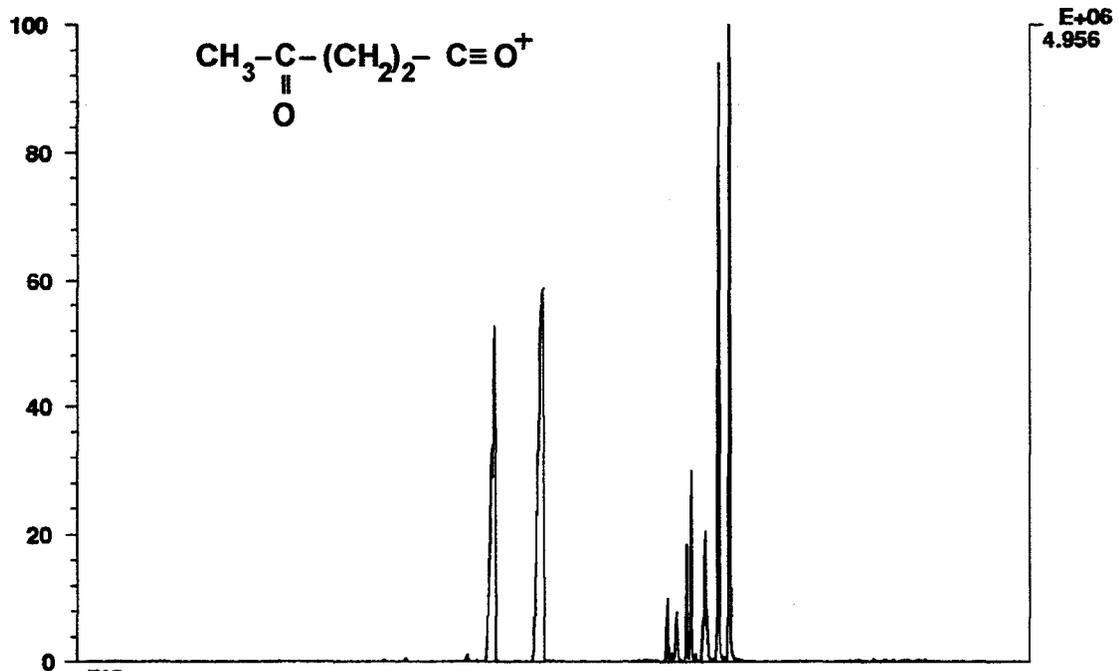
A titre d'exemple, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse du mélange triméthylsilylé issu du milieu réactionnel comprenant du glucose et de l'acide lévulinique en présence d'acide sulfurique montre la présence sur le chromatogramme de pics correspondant aux espèces moléculaires  $[M+H]^+$  à  $m/z$  567 et  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  584 déterminées par spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique ( $NH_3$ ) comme étant des produits de condensation du glucose avec l'acide lévulinique (Figure 50 [b]). Dans le cas de l'acide sulfurique ou de l'acide citrique utilisés comme catalyseur, des composés supplémentaires apparaissent sur les chromatogrammes. Ces composés correspondent aux 1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucoses sous formes pyranique et furanique libres, au glucose libre (anomérie  $\alpha$  et  $\beta$  des formes pyranique et furanique) et à des disaccharides (glucose-glucose) triméthylsilylés. Ce même mélange non dérivé a aussi été analysé par ES et le spectre confirme, par la présence de l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  301, l'existence du produit de condensation du glucose avec l'acide lévulinique. Le spectre présente l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  139 de l'acide lévulinique et du glucose à  $m/z$  203 ainsi que de nombreux pics non attribués.

De la même façon, tous les autres milieux réactionnels préparés ont montré une réaction de condensation des dérivés de dégradation du glucose (HMF et acide lévulinique) sur un résidu de glucose ou de sorbitol que se soit en présence d'acide citrique ou d'acide sulfurique. Le Tableau 25 regroupe les masses des différents dérivés et les espèces moléculaires correspondantes obtenues par GC/MS et par ES.

Les quantités relatives des produits de condensation, monomère-produit de dégradation, varient en fonction des conditions expérimentales. Le rendement de synthèse semble plus intense en présence d'acide sulfurique qu'en présence d'acide citrique.

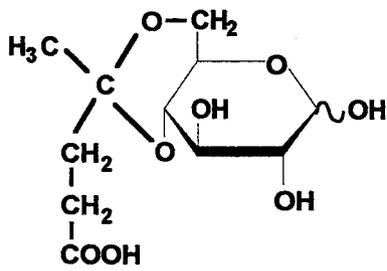
Après la mise en évidence des produits de condensation, la seconde étape a été de déterminer le type de liaison chimique entre les deux entités. Le Tableau 26 résume les différents cas possibles selon le groupement fonctionnel de la molécule participant à la liaison et la Figure 51 décrit des exemples de structures possibles.

a. Spectre EI: reconstitution sur l'ion m/z 99

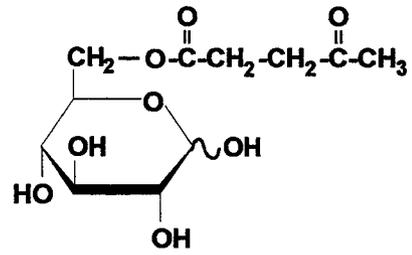


b. Chromatogramme en phase gazeuse

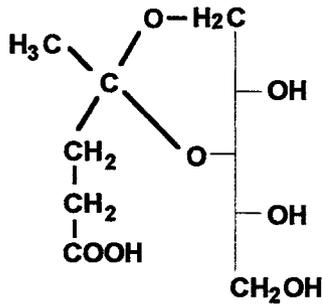
Figure 50: a. Chromatogramme en phase gazeuse du milieu réactionnel glucose/acide lévulinique/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  triméthylsilylé  
 b. Spectre en mode d'impact électronique - reconstitution sur l'ion m/z 99



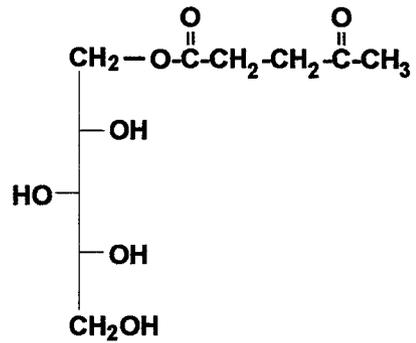
glucose-acide lévulinique  
liaison acétalique



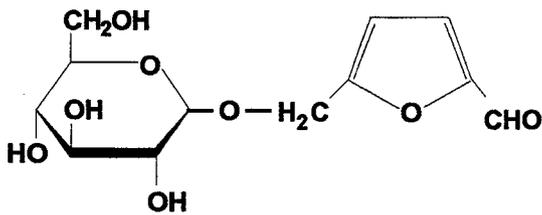
glucose-acide lévulinique  
liaison ester



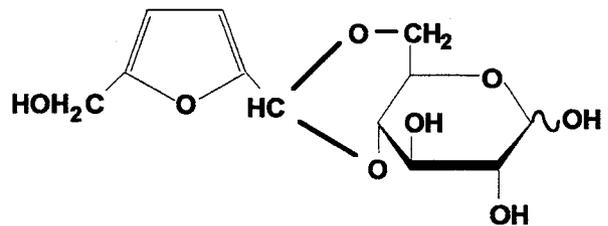
sorbitol-acide lévulinique  
liaison acétalique



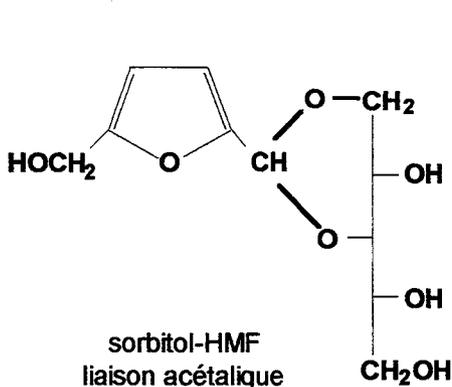
sorbitol-acide lévulinique  
liaison ester



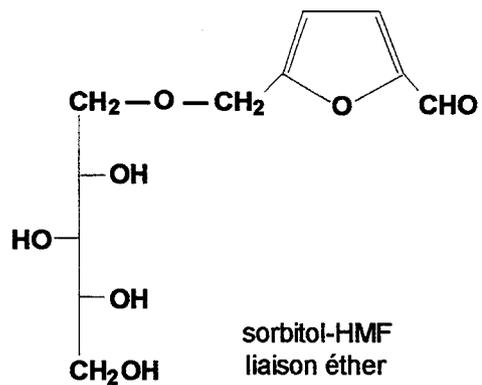
glucose-HMF  
liaison osidique



glucose-HMF  
liaison acétalique



sorbitol-HMF  
liaison acétalique



sorbitol-HMF  
liaison éther

Figure 51: Hypothèses de structure des composés glucose-acide lévulinique, sorbitol-acide lévulinique, glucose-HMF et sorbitol-HMF en fonction du type de liaison entre des deux entités

Tableau 25: Masse moléculaire et espèces moléculaires obtenues par GC/MS en mode CI (NH<sub>3</sub>) des produits issus de la condensation du glucose ou du sorbitol avec le HMF ou l'acide lévulinique

Produit de condensation	MM	GC/MS CI (NH <sub>3</sub> ) Dérivés TMS		ES
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	Natifs [M+Na] <sup>+</sup>
Glucose - HMF	288	577	594	311
Glucose - Acide lévulinique	278	567	584	301
Sorbitol - HMF	290	651	668	313
Sorbitol - Acide lévulinique	280	641	658	303

Tableau 26: Types de liaisons possibles entre la fonction aldéhydique du glucose (ou la fonction alcool du sorbitol) et les produits de dégradation du glucose

Sucre	Produit de dégradation	Fonction	Type de liaison
Glucose	HMF	CH <sub>2</sub> OH	osidique
		CHO	acétalique
	Acide lévulinique	C=O	cétalique
		COOH	ester
Sorbitol	HMF	CH <sub>2</sub> OH	éther
		CHO	acétalique
	Acide lévulinique	C=O	cétalique
		COOH	ester

Quelque soit la liaison entre les deux entités, la masse moléculaire du produit de condensation est la même, aussi les analyses précédentes par GC/MS et par ES n'ont pas permis de caractériser le type de liaison. Seule l'analyse des fragments résultant, par exemple d'une ionisation électronique, pouvait nous apporter des informations. Concernant les composés contenant de l'acide lévulinique, c'est-à-dire glucose-acide lévulinique et sorbitol-acide lévulinique, les spectres obtenus par GC/MS en mode d'impact électronique ont montré un ion à  $m/z$  99 très intense (Figure 50 [a]). Cette espèce moléculaire résulterait de la formation d'un ion oxonium suggérant ainsi une liaison ester entre l'acide lévulinique et le glucose (ou le sorbitol). Quant aux produits de condensation avec le HMF que sont le glucose-HMF et le sorbitol-HMF, les spectres d'impact électronique correspondant n'ont pas été facilement interprétés.

Une dérivation spécifique des fonctions aldéhydiques ou cétoniques par oximation nous a permis d'obtenir des dérivés après triméthylsilylation de masses variable selon le type de liaison formé. L'oximation s'effectue uniquement sur une fonction aldéhydique ou cétonique libre. L'analyse par GC/MS en mode  $CI(NH_3)$  des milieux synthétiques oximés et triméthylsilylés montre la présence des composés sorbitol-HMF liés par liaison éther et liaison acétalique ainsi que celle des composés sorbitol-acide lévulinique liés par liaison cétalique ou ester (Figure 52). Le milieu glucose/HMF, analysé dans les mêmes conditions, présente un chromatogramme pour lequel l'espèce moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  664 est très faiblement représenté. L'analyse du milieu glucose/acide lévulinique nous a permis d'obtenir l'espèce moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  741 spécifique d'une liaison ester. Par contre, nous n'avons pas observé l'espèce à  $m/z$  654 ce qui suggère la faible probabilité de liaison cétalique entre ces deux entités. Le Tableau 27 regroupe la masse des différentes molécules après oximation et triméthylsilylation ainsi que la valeur de l'espèce moléculaire  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$  selon le type de liaison entre les deux entités.

La dernière partie de notre travail concernant les produits de dégradation des monomères a été la mise en évidence des composés précédemment décrits dans les produits issus de polycondensation que sont le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I. Ces polymères ont alors été oximés et triméthylsilylés. L'analyse par GC/MS en mode  $CI(NH_3)$  du polyglucose Roquette I confirme par la présence de l'espèce moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  741 l'existence de composés glucose-acide lévulinique liés par des liaisons esters. Dans le polydextrose Pfizer A, nous avons détecté les espèces moléculaires correspondant aux composés, glucose-acide lévulinique liés par liaison ester, sorbitol-HMF liés par liaisons éther

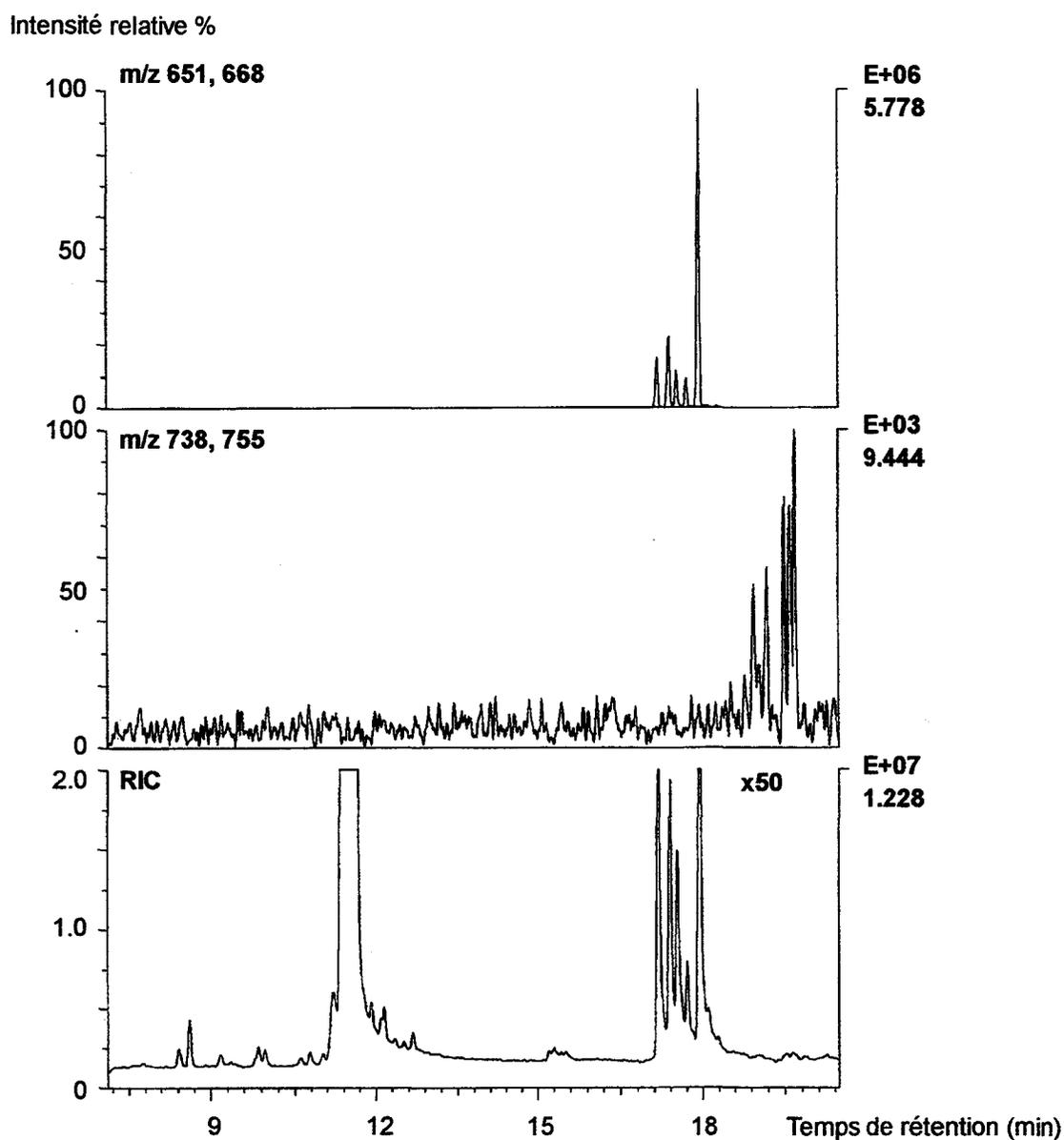


Figure 52: Chromatogramme en phase gazeuse du milieu synthétique sorbitol-HMF oximé et triméthylsilylé, reconstitution sur les ions  $[M+H]^+$  à m/z 651 et 668 et  $[M+NH_4]^+$  à m/z 668 et 755, caractéristiques respectivement d'une liaison acétalique et éther.

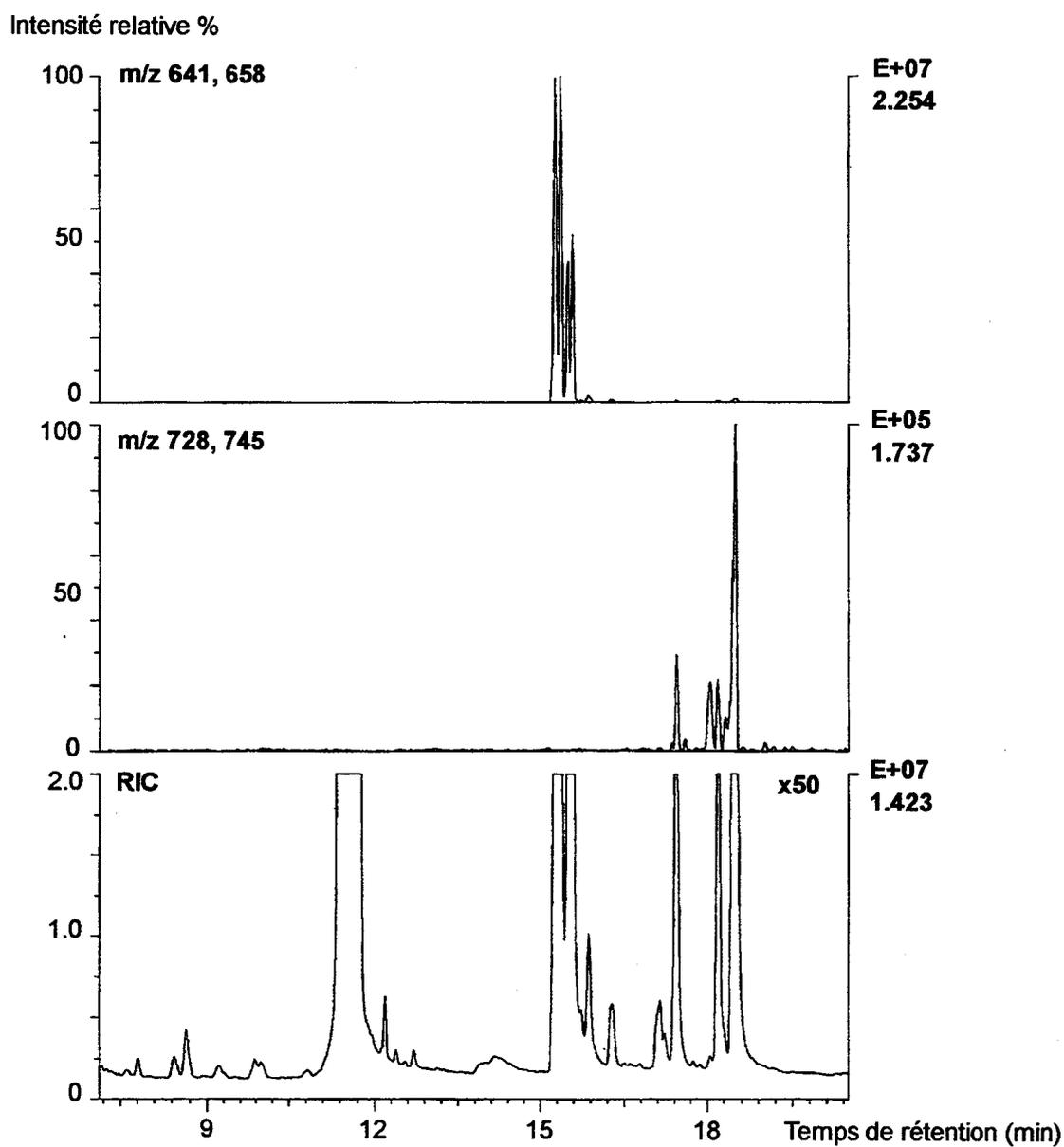


Figure 52 (suite): Chromatogramme en phase gazeuse du milieu synthétique sorbitol-acide lévulinique oximé et triméthylsilylé, reconstitution sur les ions  $[M+H]^+$  à m/z 641 et 728 et  $[M+NH_4]^+$  à m/z 658 et 745, caractéristiques respectivement d'une liaison cétalique et ester.

et acétalique et sorbitol-acide lévulinique liés par liaisons cétales et ester. Par ailleurs, ces composés ont été recherchés sur les spectres ES des produits natifs (Figure 53). Les spectres montrent la présence de l'ion à  $m/z$  311 correspondant à l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  de composés glucose-HMF dans le polyglucose et des ions à  $m/z$  301, 311 et 313 correspondant respectivement aux composés glucose-acide lévulinique, glucose-HMF et sorbitol-HMF.

De plus, nous avons observé sur toute la répartition glucidique des deux polymères des composés présentant un incrément de masse de 162 Da qui suggère l'incorporation du HMF et de l'acide lévulinique dans des oligosaccharides de plus grande taille.

Pour conclure, la technique de GC/MS en mode  $CI(NH_3)$  appliquée aux polymères oximés et triméthylsilylés ainsi que l'analyse électrospray des polymères natifs ont permis la mise en évidence des quatre composés, glucose-HMF, glucose-acide lévulinique, sorbitol-HMF et sorbitol-acide lévulinique, dans le polydextrose Pfizer A et des deux composés, glucose-HMF et glucose-acide lévulinique, dans le polyglucose Roquette I. La caractérisation du type de liaison entre les deux entités a été effectuée grâce à l'analyse des produits de condensation issus de milieux enrichis en produit de dégradation (HMF ou acide lévulinique) oximés et triméthylsilylés. Etant donné les conditions expérimentales, ces résultats ont été extrapolés aux polymères. Nous suggérons la présence de molécules de glucose-HMF liés par liaison osidique ou acétalique, la présence de glucose-acide lévulinique liés par liaison ester dans le polyglucose Roquette I. Dans le polydextrose Pfizer A, aux cas précédents décrits s'ajoutent les produits de la condensation du sorbitol que sont les molécules de sorbitol-HMF liés par liaison éther et acétalique et sorbitol-acide lévulinique liés par liaison cétales et ester. Les résultats ont été résumés dans le Tableau 28.

Tableau 27: Masse moléculaire et espèce moléculaire  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$  des produits de condensation oximés et triméthylsilylés en fonction du type de liaison.

Sucre	Produit de dégradation	Type de liaison	espèce $[M+H]^+$	espèce $[M+NH_4]^+$
Glucose	HMF	osidique	664	681
		acétalique	664	681
	acide lévulinique	cétalique	654	671
		ester	741	758
Sorbitol	HMF	éther	738	755
		acétalique	651	668
	acide lévulinique	cétalique	641	658
		ester	728	745

Tableau 28: Résumé des produits de condensation mis en évidence dans le polyglucose Roquette I et dans le polydextrose Pfizer A ainsi que les liaisons supposées présentes par analogie avec les milieux de synthèse.

Polyglucose Roquette I	Produit de dégradation	Type de liaison
Glucose	HMF	osidique ?
		acétalique ?
	acide lévulinique	ester
Polydextrose Pfizer A	Produit de dégradation	Type de liaison
Glucose	HMF	osidique ?
		acétalique ?
	acide lévulinique	ester
Sorbitol	HMF	éther
		acétalique
	acide lévulinique	ester
		cétalique

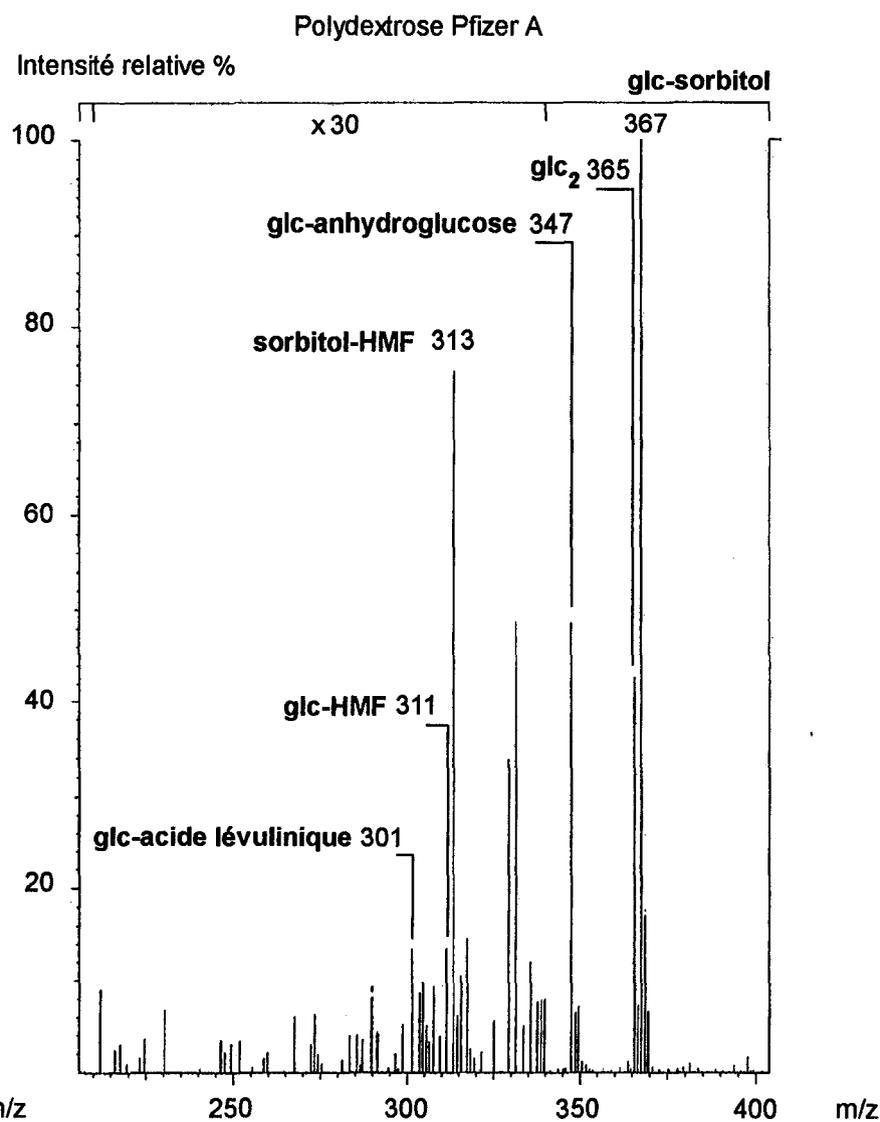
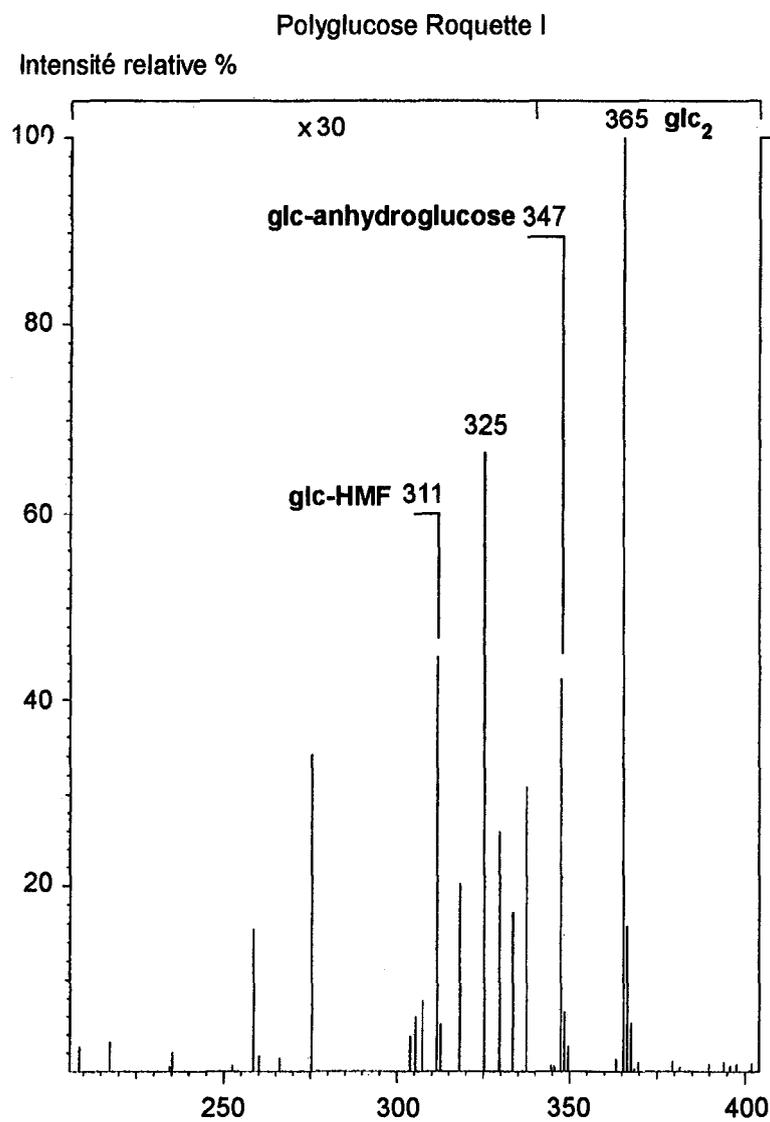


Figure 53: Spectres ES/MS en mode positif du polyglucose Roquette I et du polydextrose Pfizer A natifs  
Recherche des composés X-HMF et X-acide lévulinique (X = glucose ou sorbitol)

Ces analyses ont montré la composition et les liaisons possibles des produits de condensation entre le glucose (ou le sorbitol) et un produit issu de la dégradation à chaud et en milieu acide des sucres, le HMF ou l'acide lévulinique. Cet ensemble de résultats a permis de confirmer l'hétérogénéité et la complexité des composés constituant les polymères de type polydextrose. Cette hétérogénéité est certainement encore accrue par la possibilité de condensation d'autres produits de dégradation car notre étude s'est volontairement limitée aux produits majoritaires que sont le HMF et l'acide lévulinique. Les produits de condensation, en faibles quantité certes, expliquent la présence de nombreux signaux considérés, jusqu'ici comme du bruit de fond sur les différents spectres de masse par ES et MALD et attribué maintenant aux substances humiques.

### Inventaire des points de branchement (GC et GC/MS en EI)

L'enchaînement des réactions de méthylation, de méthanolyse et d'acétylation permet de substituer les hydroxyles engagés dans les liaisons osidiques par des groupements acétyles. Une analyse par chromatographie en phase gazeuse réalise alors la séparation et l'identification des dérivés partiellement méthylés et acétylés par leur temps de rétention, qu'une analyse par spectrométrie de masse en mode d'impact électronique permet ensuite de confirmer par étude des fragments obtenus. Le Tableau 29 indique les différents éthers méthyliques identifiés dans les deux produits, le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette II, ainsi que leurs proportions relatives. Le polyglucose Roquette II est le résultat du polyglucose Roquette I traité à la glucose oxydase. Dans le polydextrose Pfizer A, la présence de 11% de sorbitol est démontrée. Cette valeur expérimentale est en accord avec les conditions de mise en oeuvre du produit. Dans les deux produits, nous observons la présence de glucoses mono, di et trisubstitués. Les deux produits présentent une distribution des liaisons glycosidiques assez semblable démontrant une grande diversité de structure. En effet, pour ainsi dire toutes les liaisons sont retrouvés dans les deux produits.

Cependant, l'interprétation du tableau est délicate car certains résultats peuvent s'avérer ambigus. Le pourcentage attribué aux perméthyl-glucoses correspond aux glucoses terminaux non réducteurs et au glucose libre encore appelé glucose résiduel. Les éthers méthyliques acétylés en 6 sont représentatifs des glucoses substitués en 6 mais aussi des 1,6 anhydroglucoses libres car la liaison acétalique interne est coupée lors de la méthanolyse.

Tableau 29: Composition en éthers méthylés partiellement acétylés représentant les liaisons osidiques du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette II<sup>(a)</sup>

	<b>Polydextrose Pfizer A</b>	<b>Polyglucose Roquette II<sup>(a)</sup></b>
	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>Glucoses perméthylés</b>	<b>22,5</b>	<b>19,7</b>
<b>Glucoses mono-acétylés</b>	<b>41,8</b>	<b>48,2</b>
glucoses substitués en 6	17,6	22
glucoses substitués en 3	9,4	10,8
glucoses substitués en 4	14,8 (somme des glc	9,4
glucoses substitués en 2	en 2 et en 4)*	6
<b>Glucoses di-acétylés</b>	<b>22,6</b>	<b>28,8</b>
glucoses substitués en 2 et 3	1,2	2,8
glucoses substitués en 2 et 6	3	5,4
glucoses substitués en 2 et 4	6,2 (somme des glc	3,9 (somme des glc
glucoses substitués en 3 et 4	liés en 2,4 et en 3,4)*	liés en 2,4 et en 3,4)*
glucoses substitués en 3 et 6	15,2 (somme des glc	16,6 (somme des glc
glucoses substitués en 4 et 6	liés en 3,6 et en 4,6)*	liés en 3,6 et en 4,6)*
<b>Glucoses tri-acétylés</b>	<b>2,5</b>	<b>3,3</b>
glucoses substitués en 2, 3 et 6	2,5	3,3
<b>Sorbitol perméthylé et acétylé</b>	<b>11</b>	<b>0</b>

\* coélutions

<sup>(a)</sup> le polyglucose Roquette II est le polyglucose Roquette I traité à la glucose oxydase

Tableau 30: Détermination des degrés de substitution des résidus de glucose des polymères glucidiques. Les pourcentages présentés sont les valeurs du Tableau 29 corrigées de la présence du sorbitol.

	<b>Polydextrose Pfizer A</b>	<b>Polyglucose Roquette II</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>Glucoses perméthylés</b>	25,2	19,7
<b>Glucoses mono-acétylés</b>	46,7	48,2
<b>Glucoses di-acétylés</b>	25,3	28,8
<b>Glucoses tri-acétylés</b>	2,8	3,3
<b>Glucoses tétra-acétylés</b>	-	-

D'autre part, les valeurs tiennent compte de la présence du sorbitol dans le cas du polydextrose Pfizer A. Des résidus de sorbitol mono, di, tri et même tétra-substitués ont été mis en évidence par GC/MS en mode d'ionisation chimique lors de la recherche de l'espèce moléculaire  $[M+NH_4]^+$  respectivement à  $m/z$  312, 340, 368 et 396 suggérant une incorporation du sorbitol dans le polymère non seulement comme résidu à la place du monomère en position terminale réductrice, générant ainsi une molécule non réductrice, mais aussi comme point de ramification sur lequel viennent se brancher des monomères de glucose. Afin de comparer les pourcentages des résidus de glucose substitués, il a donc fallu exprimer les pourcentages en enlevant les 11% de sorbitol du polydextrose Pfizer A. Le Tableau 30 correspondant à ce calcul permet la comparaison de la substitution des résidus de glucose des deux polymères. La participation des perméthyl-glucoses en position terminale réductrice a été estimée en soustrayant le pourcentage de glucose résiduel libre, déterminé antérieurement par dosage enzymatique, égal à 2,8% pour le polydextrose Pfizer A et 0,8% pour le polyglucose Roquette II. Ce pourcentage est égal à 22,4 pour le polydextrose et 18,9 pour le polyglucose. La différence de 3,5% de glucoses perméthylés dans le polydextrose Pfizer A peut être attribuée à l'influence des résidus de sorbitol positionnés à l'intérieure de la chaîne oligosaccharidique et qui sont substitués par plusieurs résidus de glucose grâce à des liaisons acétaliques. Dans ce cas, l'oligosaccharide alditol possède alors deux glucoses en position terminale non réductrice. La comparaison des taux de glucoses substitués ne montre pas de différence très importante dans le taux de substitution. Les glucoses mono, di et tri-acétylés apparaissent en quantité légèrement supérieure dans le cas du polyglucose. Cette observation associée à l'hypothèse précédente de présence de résidus sorbitol intrachaines permet de penser que la condensation des monomères de glucose est influencée par la présence de sorbitol. Le polyglucose nous sert en effet de polymère témoin sans sorbitol qui montre une polymérisation des glucoses de différents degrés de substitution. Lorsque le sorbitol est introduit au milieu réactionnel, il est intégré dans le polymère majoritairement en position terminale ou alors comme agent de réticulation dans l'oligosaccharide. Dans ce deuxième cas, il semble limiter le branchement des résidus de glucose ce qui est exprimé par une diminution du taux de glucoses mono, di et tri-acétylés dans le cas du polydextrose Pfizer A.

Malgré de nombreuses difficultés, certains pourcentages, marqués d'un astérisque, correspondent à une somme de surface due à la co-élution de deux éthers méthyliques différents, de nombreux pics présents sur le chromatogramme mais en très faible quantité ne sont pas attribués de façon précise; pourtant certains d'entre-eux correspondent à des cycles

furaniques et ceci a été observé pour les deux produits. Le polydextrose et le polyglucose présentent une distribution des liaisons glycosidiques assez semblable démontrant une grande diversité de structure et une dominance des substitutions en 6 et en 4.

### Estimation du degré de ramification par analyse des éthylglucosides perméthylés

La méthode de détermination des points de substitution par méthylation, méthanolyse et peracétylation dont les résultats ont été présentés dans le paragraphe précédent génère des méthylglycosides partiellement acétylés. Comme nous l'avons observé, cette méthode a pour désavantage de libérer tous les isomères des sucres soit les formes pyranique et furanique et leur anomère  $\alpha$  et  $\beta$  respectifs produisant des chromatogrammes complexes, avec de nombreuses coélutions. Une autre stratégie comprenant l'enchaînement de quatre réactions, réduction au KBD<sub>4</sub>, méthylation, éthanolyse et perdeutérométhylation, nous a permis de fournir des résultats complémentaires en estimant le degré de substitution des résidus de glucose des polymères glucidiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) en mode d'ionisation chimique (CI). L'ionisation chimique utilisant comme gaz réactant l'ammoniac a été choisie pour l'étude et les espèces moléculaires obtenues pour un éthylglucoside perméthylé sont  $[M+H]^+$  à  $m/z$  265,  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  282. L'ion B<sub>1</sub> à  $m/z$  219 résulte d'une fragmentation par perte d'un groupement O-éthyl du carbone 1 et son adduit avec NH<sub>3</sub> est observé à  $m/z$  236.

La stratégie appliquée à un trisaccharide réducteur est présentée dans la Figure 54. Le tétraméthyl O-éthylglucoside de masse moléculaire 264 représente le motif de glucose en position terminale non réductrice (d<sub>0</sub>). Le triméthyl monodeutérométhyl O-éthylglucoside de masse moléculaire 267 correspond à un motif de glucose monosubstitué (d<sub>1</sub>). Le glucitol deutéré, monodeutérométhylé et méthylé exprime le résidu de glucose en position terminale réductrice et il possède une masse moléculaire de 270. Lorsque les oligosaccharides sont constitués de glucoses plurisubstitués, nous obtenons les dérivés décrits dans la Figure 55 et des masses moléculaires de 270, 273 et 276 qui correspondent respectivement aux glucoses disubstitués (d<sub>2</sub>), trisubstitués (d<sub>3</sub>) et tétrasubstitués (d<sub>4</sub>). Le Tableau 31 regroupe les différents degré de substitution des résidus de glucose ainsi que leur masse moléculaire et la valeur de leurs ions  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$  respectifs.

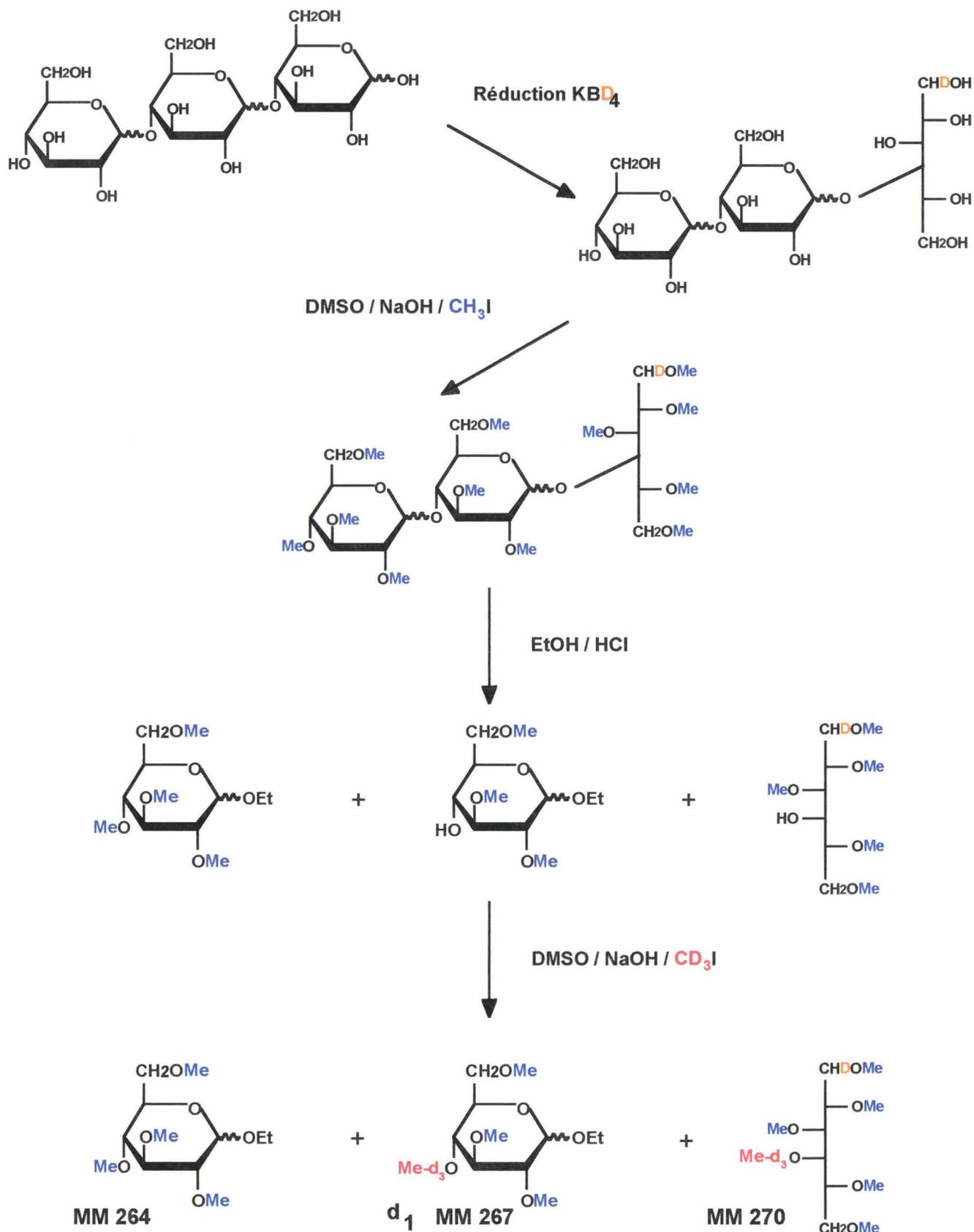


Figure 54: Stratégie de détermination du taux de ramification par réduction (D), perméthylation, éthanolyse et deutérométhylation

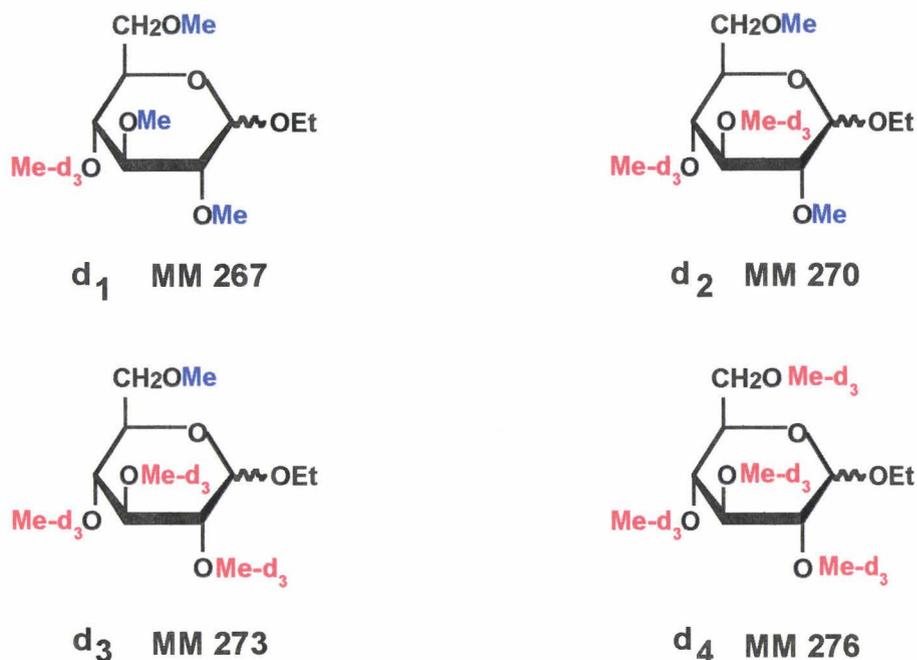


Figure 55: Résultat de la stratégie de réduction (D), méthylation, éthanolyse et deutérométhylation appliquée aux glucoses substitués

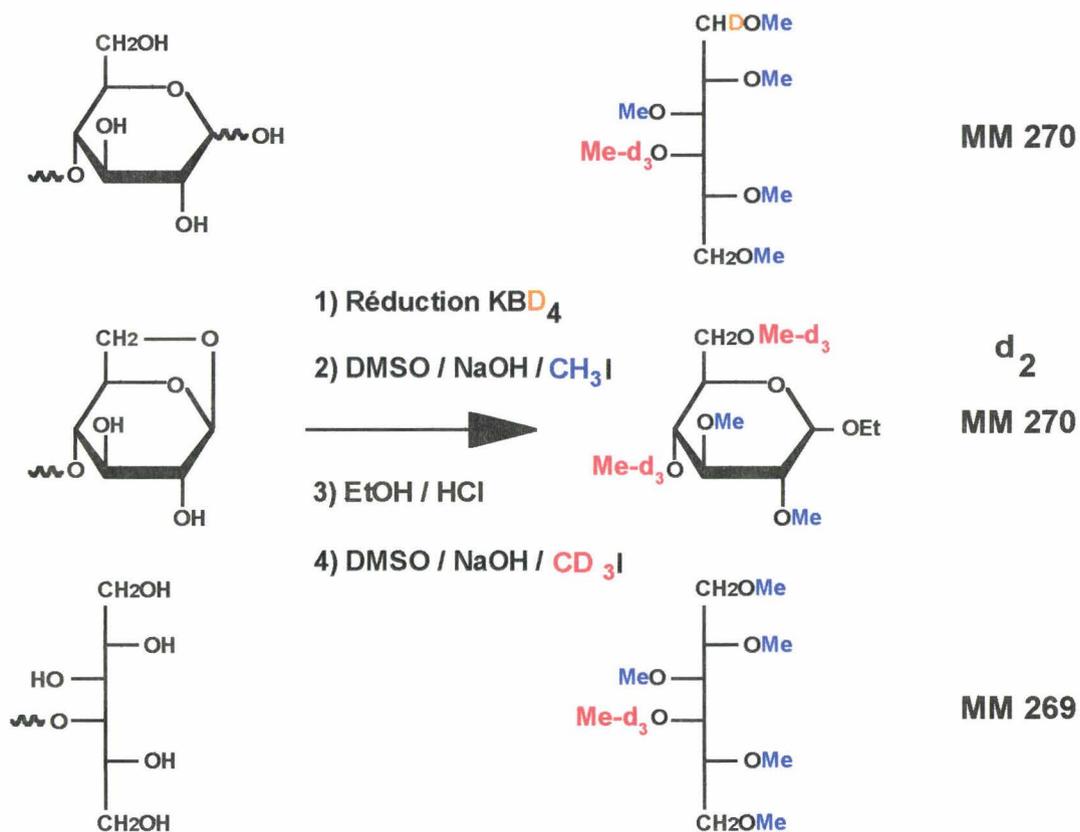


Figure 56: Stratégie de réduction (D), méthylation, éthanolyse et deutérométhylation appliquée aux motifs anhydroglucose et sorbitol terminaux

Tableau 31: Masse moléculaire,  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$  des différents degrés de substitution du glucose obtenus après réduction (D), méthylation, éthanolyse et deutérométhylation des échantillons et leur analyse par GC/MS en mode d'ionisation chimique ( $NH_3$ ).

Substitutions du glucose	Masse moléculaire	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$
$d_0$	264	265	282
$d_1$	267	268	285
$d_2$	270	271	288
$d_3$	273	274	291
$d_4$	276	277	294

Cette stratégie permet de quantifier le nombre d'atome de deutérium apporté par le  $CD_3I$  et de définir ainsi le degré de substitution des résidus de O-éthylglucosides perméthylés. Cette quantification est possible car les espèces O-éthylglucosides qu'elles soient mono-, di-, tri- ou tétra-deutérométhylées possèdent toutes le même coefficient de réponse. La Figure 56 présente le résultat de la stratégie appliquée aux motifs particuliers d'anhydroglucose et de sorbitol contenus dans les polymères glucidiques, Pfizer A et Roquette I.

La Figure 57 présente deux exemples de produit qui nous ont servis de témoins: le panose et le Glucidex 33. Le spectre du panose, trisaccharide de structure glc-glc-glc, constitué uniquement de résidu de glucose monosubstitué est exprimé par  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  285 en plus du perméthyl O-éthylglucoside sous forme  $[M+NH_4]^+$  à  $m/z$  282. Le motif correspondant à l'alditol terminal n'est pas observé sur le spectre car les alditoles ont un temps de rétention différent de celui des perméthyl O-éthylglucosides. Comme attendu, le panose est donc constitué d'un taux de 100% de degré de substitution  $d_1$ . L'exemple du Glucidex montre la présence des ions  $[M+NH_4]^+$  de glucose mono ( $d_1$ ) et disubstitués ( $d_2$ ) respectivement égaux à  $m/z$  285 et 288 et correspondant aux glucoses liés en  $\alpha(1-4)$  et aux glucose liés en  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-6)$  de l'amidon hydrolysé.

Les spectres de la Figure 58 montre les résultats de cette stratégie appliquée aux polymères glucidiques polydextrose Pfizer A et polyglucose Roquette I. Les produits présentent les degrés de substitution  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  et même  $d_4$  pour le polydextrose Pfizer A. Le Tableau 32 rassemble les pourcentages des différents degrés de substitution obtenus sur les échantillons.

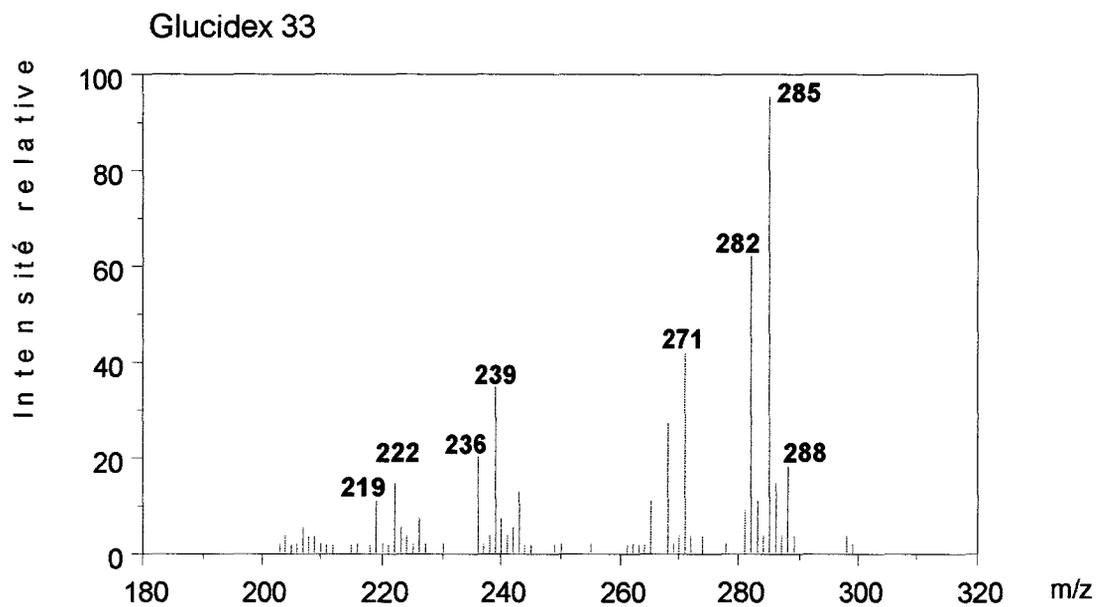
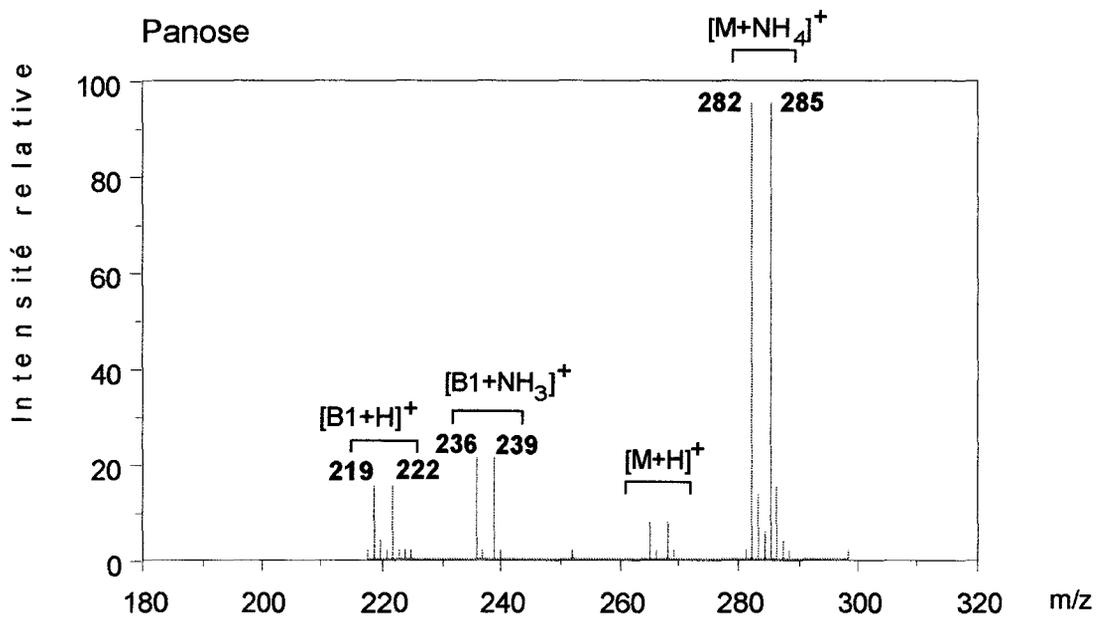


Figure 57: Spectres de masse en mode  $CI(NH_3)$  du panose et du Glucidex 33 réduits (D), méthylés, éthanolysés et perdeutérométhylés

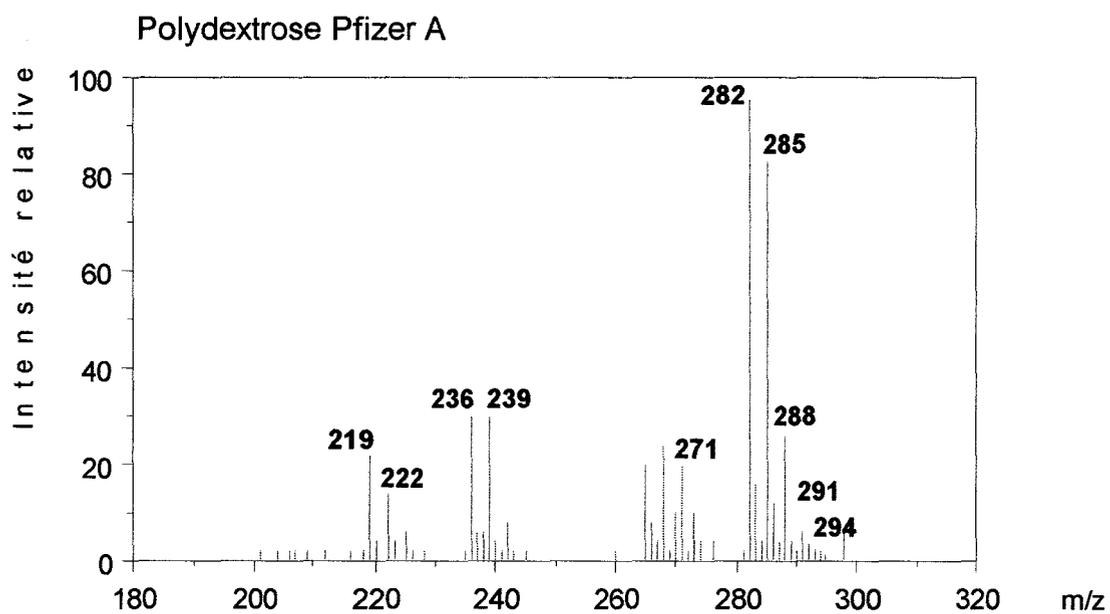
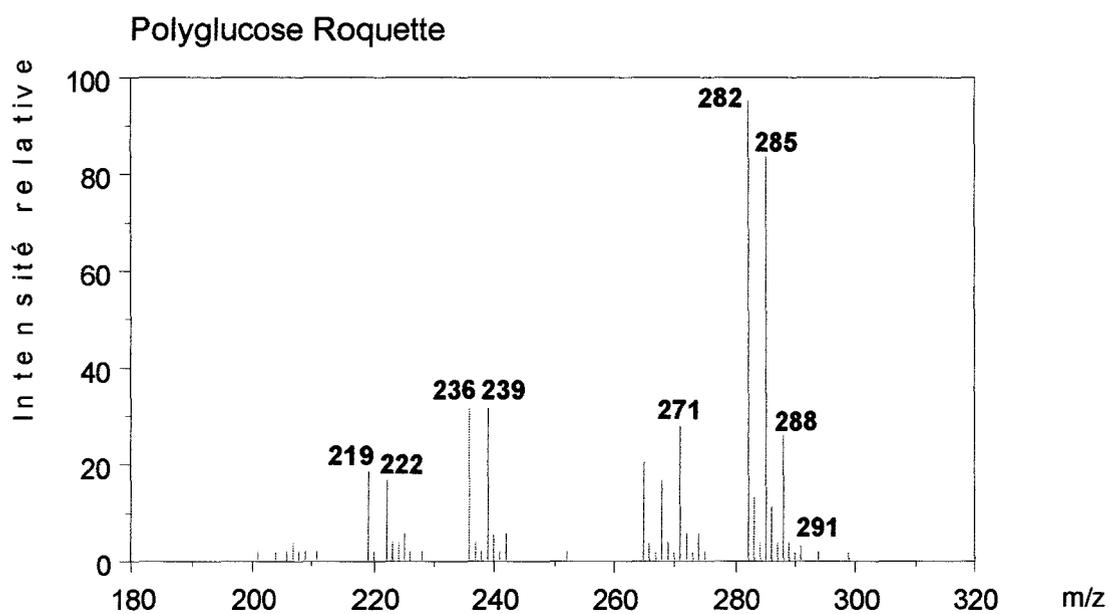


Figure 58: Spectres de masse en mode CI (NH<sub>3</sub>) du polyglucose Roquette I et du polydextrose Pfizer A réduits (D), méthylés, éthanolysés et perdeutérométhylés

Tableau 32: Quantification du taux de branchement des résidus de glucose traités par réduction (D), méthylation, éthanolyse et deutérométhylation et analysés par GC/MS en CI ( $\text{NH}_3$ )

$m/z$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	degré de substitution	Panose	Glucidex 33
285	$d_1$	100%	89,4%
288	$d_2$	-	10,6%
291	$d_3$	-	-
294	$d_4$	-	-

$m/z$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	degré de substitution	Polydextrose Pfizer A	Polyglucose Roquette I
285	$d_1$	72,2%	74,7%
288	$d_2$	22 %	21,3%
291	$d_3$	5,1%	4%
294	$d_4$	1,7%	-

Au moment de l'interprétation des résultats, il faut savoir que les anhydroglucoses libres substitués par une seule molécule de  $\text{CD}_3\text{I}$  augmentent le pourcentage de glucoses monosubstitués car la liaison acétalique interne est coupée à l'éthanolyse comme le montre la Figure 56. De même, les anhydroglucoses intégrés aux oligosaccharides apparaissent sous forme de glucoses disubstitués ( $d_2$ ).

D'autre part, il faut préciser que ces résultats sont une première estimation du taux de ramification des résidus de glucose au sein des polymères glucidiques car nous avons observé une variation du rapport entre les ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  et  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  selon de degré de substitution. Les calculs effectués en faisant la somme des ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  et  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , puis la somme des deux ions précédents et les ions  $\text{B}_1$  ont été comparés aux précédents et n'expriment pas de différence par rapport au calcul effectué sur l'ion  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  seul comme c'est le cas dans le tableau présenté. La fragmentation obtenue lors de l'ionisation par l'ammoniac n'affecte donc pas de façon significative la quantification du taux de substitution.

Cette méthode, somme toute simple, permet de déterminer rapidement les proportions des degrés de substitutions  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  et  $d_4$  des résidus de glucose. Le polydextrose Pfizer A

semble légèrement plus ramifié que le polyglucose Roquette I car ce dernier ne fait pas apparaître de degré de substitution  $d_4$ . Toutefois la différence entre les deux polymères n'est pas significative et les taux de substitutions des résidus de glucoses semblent très équivalents.

D'autre part, des produits secondaires (anhydroglucoses libres et substitués) faussent les résultats. Pour pallier ce problème, une stratégie plus élaborée devrait être appliquée. Une estimation du pourcentage des anhydroglucoses, des sorbitols et des glucoses pourrait être réalisée par l'enchaînement des réactions de réduction, acétolyse, réduction (D), méthylation, éthanolyse et deutérométhylation puis analyse des produits formés par GC/MS en  $CI(NH_3)$ . Ces analyses apporteraient une correction aux pourcentages donnés précédemment. La position des groupes deutérométhyles peut quant-à-elle être déterminée par spectrométrie de masse en tandem afin de positionner la substitution des résidus de glucoses. Pour cette raison, les éthylglycosides ont été préférés au méthylglycosides afin de différencier les groupements en position 1 de ceux en position 2, 3, 4 ou 6 dans les expériences de MS/MS.

## Conclusion

L'analyse structurale globale du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique selon différentes approches en fonction des points d'investigation étudiés. Sous l'apparente simplicité des résultats issus de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits méthanolysés et triméthylsilylés qui démontre l'unique présence de glucose pour le polyglucose Roquette I et de glucose et de sorbitol pour le polydextrose Pfizer A, reflétant la mise en oeuvre des produits, se cache une très grande hétérogénéité de structure déjà révélée par la résonance magnétique nucléaire et par les différents dosages ayant déterminés la composition chimique de ces polymères glucidiques. Cette hétérogénéité a été confirmée à maintes reprises entre autre par spectrométrie de masse.

L'analyse des points de branchement des produits méthylés, méthanolysés et acétylés a confirmé la possibilité de réaliser toutes les liaisons par condensation sur les résidus de glucose. Les liaisons en 2, 3, 4 et 6 ont été observées. Des glucoses disubstitués et des glucoses trisubstitués ont été aussi mis en évidence. Dans tous les cas, les liaisons en 6 sont prédominantes puis celles en 4 car elles ont une vitesse de réaction supérieure. De plus, ces analyses ont permis de mettre en évidence chez le polydextrose Pfizer A des résidus de sorbitol, mono, di, tri et même tétrasubstitués. Ce résultat suggère que le sorbitol peut se

placer dans un oligosaccharide à la place du glucose en position terminale réductrice mais aussi dans la chaîne oligosaccharidique et être responsable de la réticulation du polymère glucidique. Dans le second cas, le branchement peut être obtenu par formation de liaison éther ou de plusieurs liens acétals sur le sorbitol. Cette seconde hypothèse est sans nul doute la proposition à retenir puisque les composés sont éthanolisables.

L'analyse du taux de ramification des résidus de glucoses a été effectuée après réduction (D), méthylation, éthanolyse et deutérométhylation des polymères glucidiques et analyse des dérivés obtenus par GC/MS en mode CI(NH<sub>3</sub>). Les substitutions d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>, d<sub>3</sub> et même d<sub>4</sub> correspondant aux résidus de glucose mono, di, tri et tétrasubstitués confirme bien la notion de polymère branché du polydextrose Pfizer A. Le degré de substitution d<sub>4</sub> n'a pas été observé pour le polyglucose Roquette I. Cependant la différence entre les taux de branchement des deux polymères n'est pas très significative.

Des entités plus complexes telles que les molécules de glucose-HMF, glucose-acide lévulinique, sorbitol-HMF et sorbitol-acide lévulinique ont été mise en évidence résultant de la condensation de résidus de glucose pour le polyglucose Roquette I (de glucose et de sorbitol pour le polydextrose Pfizer A) avec des molécules issues de la dégradation thermique en milieu acide du glucose que sont l'acide lévulinique et l'hydroxyméthylfurfural (HMF). Ces composés ont ensuite été mis en évidence dans les polymères glucidiques par ES et les liaisons sont supposées être les mêmes que celles démontrées dans les milieux synthétiques oximés et triméthylsilylés car les conditions expérimentales d'obtention des polymères glucidiques et des milieux synthétiques sont peu différentes. Les composés glucose-HMF sont alors liés par liaison osidique ou acétalique et les composés glucose-acide lévulinique par liaison ester uniquement. Les composés sorbitol-HMF sont quant-à-eux liés par liaison éther et acétalique et les composés sorbitol-acide lévulinique par liaison cétalique et ester.

Les deux produits analysés, le polydextrose Pfizer A et le polyglucose Roquette I, sont somme toute peu différents. Ils présentent une même hétérogénéité de structure, un degré de substitution maximal (d<sub>4</sub> pour le Pfizer A et d<sub>3</sub> pour le Roquette I) démontrant la notion de polymères branchés et la présence de produits de condensation faisant intervenir des molécules issues de dégradation du glucose en milieu acide, comme l'acide lévulinique et l'hydroxyméthylfurfural. La différence majeure entre les deux produits vient du fait même de la mise en oeuvre du polymère glucidique dans le sens où le sorbitol est absent du polyglucose Roquette I alors qu'il occupe la majorité des résidus terminaux "réducteurs" dans le Pfizer A.

### 5. 2. 2. Fractionnements et analyse structurale détaillée

Le but commun des analyses qui vont suivre a été de fractionner les produits afin de réaliser une approche structurale plus fine, compte tenu de l'extrême hétérogénéité de structure des produits Pfizer A et Roquette I mise en évidence notamment au cours de l'analyse structurale globale de ces polymères glucidiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). De nombreuses techniques de fractionnement ont été testées mais seules les plus intéressantes ont été retenues. Parmi celles-ci, les fractionnements par précipitation éthanolique et par chromatographie liquide à haute performance sur colonne Diol ont été appliquées dans le but d'isoler les oligosaccharide de même taille, c'est-à-dire possédant le même degré de polymérisation. La troisième approche, plus originale, a consisté en un fractionnement chimique par amination réductive des oligosaccharides réducteurs visant à séparer les espèces réductrices des anhydroglucoses et des alditols.

#### Fractionnement par précipitation éthanolique

La précipitation à l'éthanol est une technique ancienne de fractionnement de polysaccharides. Le polydextrose Pfizer A a été précipité à une concentration de 70 à 100% en éthanol de façon fractionnée à raison d'une augmentation de 5% à chaque étape. Le fractionnement est reproductible et son rendement est de l'ordre de 96%. La fraction pondérale que représente chaque fraction précipitée a été mentionnée dans le Tableau 33. La proportion de la fraction Surnageant 95% est sur-estimée car la pesée de cette fraction est difficile. Le sorbitol qu'elle renferme donne à cette fraction un comportement fortement hygroscopique. A cause de cela, le pourcentage de chacune des fractions est erroné mais il permet quand même de se rendre compte de la répartition des produits. A ce sujet, environ 20% du polydextrose Pfizer A est précipité lors de la première étape à la concentration de 70% en éthanol. Les dosages enzymatiques du glucose et du sorbitol et les analyses de chromatographie de filtration sur gel, de cryométrie, de spectrométrie de masse par MALD ainsi que la chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés ou méthylés ont été effectués sur les fractions éthanoliques obtenues. Ces différentes analyses ont été réalisées dans le but de caractériser le fractionnement. Ces résultats ont été rassemblés dans le Tableau 34.

Tableau 33: Fraction pondérale des fractions obtenues par précipitation éthanolique du polydextrose Pfizer A (5g).

Fraction	Poids	Estimation du pourcentage
Culot 70%	0,96 g	20%
Culot 75%	0,67 g	14%
Culot 80%	1,04 g	22%
Culot 85%	0,96 g	20%
Culot 90%	0,32 g	7%
Culot 95%	0,23 g	4,8%
Surnageant 95%	0,59 g*	-
<b>Total</b>	<b>4,8 g</b>	<b>96 %</b>

\*valeur erronée par la présence d'un taux d'hydratation très important de la fraction.

L'interprétation des résultats est relativement délicate car il faut tenir compte des limites de chaque technique. La détermination des rapports glucose/sorbitol par dosages enzymatiques et par chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthanolysés et triméthylsilylés sont cohérents et montrent que le rapport diminue quand le pourcentage d'éthanol augmente. Les plus hauts DP précipitent à des pourcentages en alcool plus faibles que les bas DP.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylés apporte peu de renseignements car la technique ne permet d'analyser que les oligosaccharides de DP2 à 7 en raison de la disponibilité de ces seuls témoins maltoligosaccharidiques. Pour cette raison, la fraction surnageant 95% est caractérisée par la présence des DP1 à 3, le culot 95% par les DP1 à 5 et toutes les autres fractions par les DP1 à 6. Tous les degrés de polymérisation supérieurs à 1 se présentent sous forme de massifs de pics montrant de nouveau l'hétérogénéité du produit. La proportion relative des DP varie d'une fraction à l'autre. En effet, on observe que le massif dominant de chaque fraction se déplace vers les hauts DP lorsque le pourcentage en éthanol diminue.

La cryométrie et la chromatographie de filtration sur gel ont servis à déterminer le degré de polymérisation moyen de chacune des fractions. On remarque que celui-ci diminue lorsque que le pourcentage en alcool augmente, ce qui est en accord avec les résultats précédents. Les valeurs de  $\overline{DP}$  obtenues par les deux techniques sont toutefois très différentes et l'établissement des courbes de calibration pour la cryométrie et pour la chromatographie de

Tableau 34: Analyses des fractions issues de la précipitation éthanolique du polydextrose Pfizer A

Fractions éthanoliques	Cryométrie	Filtration sur gel	MALD/MS	Chromatographie en phase gazeuse		Dosages
	DP moyen	DP moyen	DP présents	dérivés méthylés	dérivés TMS	enzymatiques
				DP présents	Rapport glucose/sorbitol	Rapport glucose/sorbitol
Culot 70 %	7	11,5	3 à 31	1 à 6	15,9	16,9
Culot 75 %	5	9	3 à 24	1 à 6	12,5	13,9
Culot 80 %	2 - 3	6,5	3 à 21	1 à 6	9,8	10,5
Culot 85 %	2 - 3	4,6	3 à 15	1 à 6	6,5	7,3
Culot 90 %	2 - 3	3,1	2 à 12	1 à 6	5,5	6
Culot 95 %	2	2,2	2 à 8	1 à 5	4,3	4,8
Surnageant 95 %	ND*	ND	2 à 5	1 à 3	4,4	5,7

\* ND signifie non déterminé

filtration sur gel réalisées avec les maltooligosaccharides réducteurs peut en être une explication. Les analyses de la fraction Surnageant 95% n'ont pas été réalisées à cause de son caractère très hygroscopique entraînant une erreur trop importante. La chromatographie de filtration sur gel semble donner les résultats les plus proches de la réalité.

La spectrométrie de masse par MALD est la technique qui nous a apporté le plus de renseignements, car rappelons-le les spectres de masse permettent de visualiser l'enveloppe glucidique et de déterminer la masse des composants de chacune des fractions. Les trois familles de produit, glucose-glucose, glucose-sorbitol et glucose-anhydroglucose, sont présentes dans chacune des fractions. On remarque aussi que lorsque le pourcentage en alcool diminue l'enveloppe glucidique présente un aplatissement progressif car la gamme de DP présents dans la fraction devient de plus en plus large. En effet, le DP2 est présent dans toutes les fractions mais le DP maximum observé augmente progressivement jusqu'à atteindre 31 pour la fraction 70%.

L'analyse des points de branchement par méthylation, méthanolyse et acétylation de chacune de ces fractions n'a pas permis de mettre en évidence un fractionnement sélectif prenant en compte la structure du produit.

L'empreinte RMN confirme la présence des plus bas DP dans les fractions de concentration croissante en éthanol par l'apparition graduelle des signaux des protons H<sub>1</sub> réducteurs en  $\alpha$  et  $\beta$ . Le spectre de la fraction Surnageant 95% présente les signaux correspondant à l'acide citrique et aux 1,6 anhydroglucoses sous formes pyrane et furane. Dans toutes les fractions, on observe le doublet à 4,9 ppm caractéristique des protons H<sub>1</sub> des glucoses liés en  $\alpha(1-6)$ .

Pour conclure, l'ensemble des analyses effectuées sur les fractions éthanoliques du polydextrose Pfizer A concordent et montrent que pour précipiter les DP selon leur taille décroissante il faut progressivement augmenter le pourcentage en éthanol. La spectrométrie de masse par MALD confirme la présence des trois familles (glucose)<sub>n</sub>, (glucose)<sub>n-1</sub>-sorbitol et (glucose)<sub>n-1</sub>-anhydroglucose à chaque degré de polymérisation et cela dans chaque fraction comme pour le produit natif. Le fractionnement éthanolique s'effectue donc en fonction de la taille des oligosaccharides présents mais indépendamment de la nature des oligosaccharides présents. D'autre part, cette technique a permis l'observation dans la fraction 70% des oligosaccharides allant jusqu'à 31 résidus (DP31) grâce à l'enrichissement de la fraction en hauts DP ce qui n'avait pas été possible dans le produit non fractionné.

Nous avons donc démontré par ces différentes analyses qu'une précipitation éthanolique de polymères glucidiques comme le polydextrose Pfizer A n'est pas une technique donnant à elle seule une résolution suffisante pour isoler chacun des degrés de polymérisation du produit.

### Fractionnement par chromatographie liquide à haute performance sur colonne Diol

Un fractionnement des polymères glucidiques natifs par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne Diol a été réalisé dans les conditions suivantes. Sur la colonne préalablement équilibrée par une solution acétonitrile/eau, 73/23 (v/v), a été injecté le produit. L'élution a été ensuite effectuée de façon isocratique par passage d'une solution acétonitrile/eau, 60/40 (v/v) pendant 10 minutes.

Les fractionnements du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I obtenus ont donné les chromatogrammes de la Figure 58. Les profils paraissent assez proches. Les fractions obtenues ont été appelées D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> et D<sub>4</sub>.

Une première analyse des fractions du polydextrose Pfizer A a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse à haute température des dérivés triméthylsilylés afin de déterminer le degré de polymérisation des oligosaccharides présents dans les fractions D<sub>0</sub> à D<sub>4</sub>. Cette analyse montre que les fractions regroupent encore un mélange de différents degrés de polymérisation, par exemple la fraction D<sub>1</sub> contient des DP1, 2 et 3. A première vue, le fractionnement sur colonne Diol ne paraissait donc pas être encore la technique idéale pour séparer les oligosaccharides des polymères glucidiques selon leur taille. Pourtant, la différence de temps de rétention entre les massifs de pics correspondant aux oligosaccharides de DP2 des fractions D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> nous ont fait suspecter un comportement particulier des oligosaccharides de degré de polymérisation 2.

Des fractionnements du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I ont alors été réalisés dans les mêmes conditions mais cette fois-ci dans un but préparatif afin de pouvoir mener une étude structurale fine des fractions. Les chromatogrammes ont montré des profils similaires. Comme le polydextrose Pfizer A présente des épaulements de pic plus marqués que le polyglucose Roquette I, les pics D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> ont été séparés en sous-fractions et chacune de ces sous-fractions, nommées de 1 à 7, ont été analysées par spectrométrie de masse en mode MALD. Le Tableau 35 résume les composés identifiés pour les deux produits. L'aspect semi-

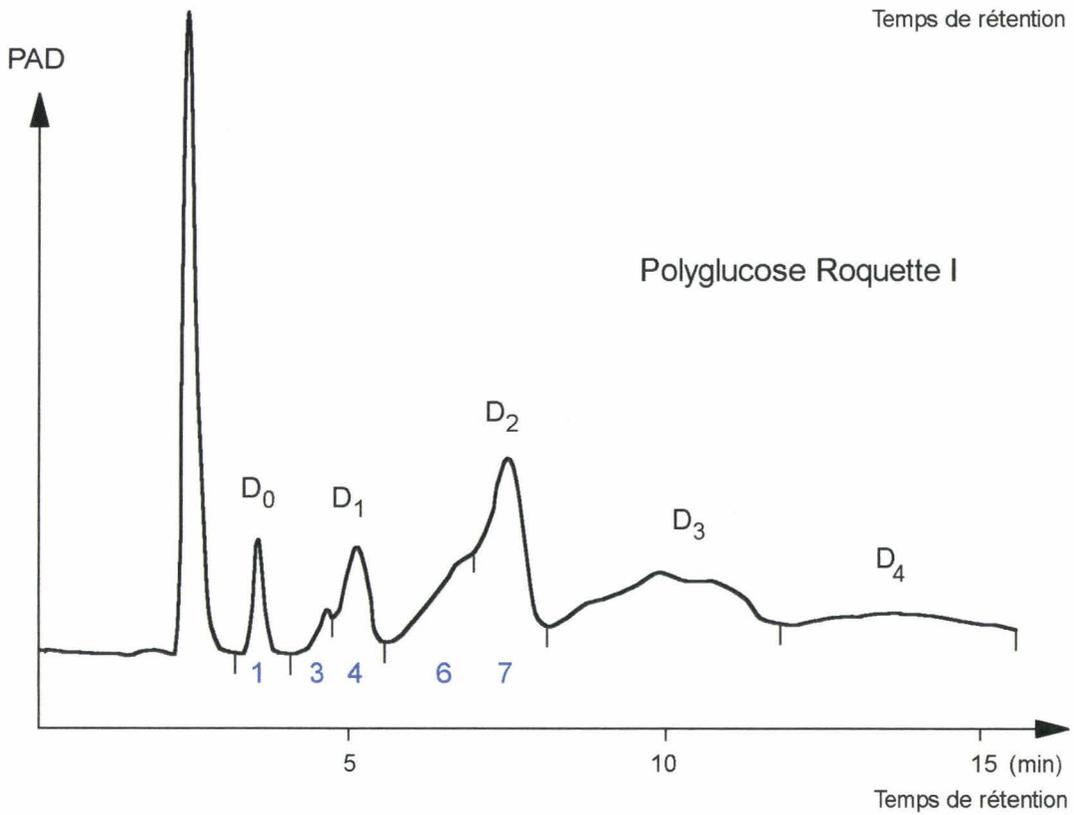
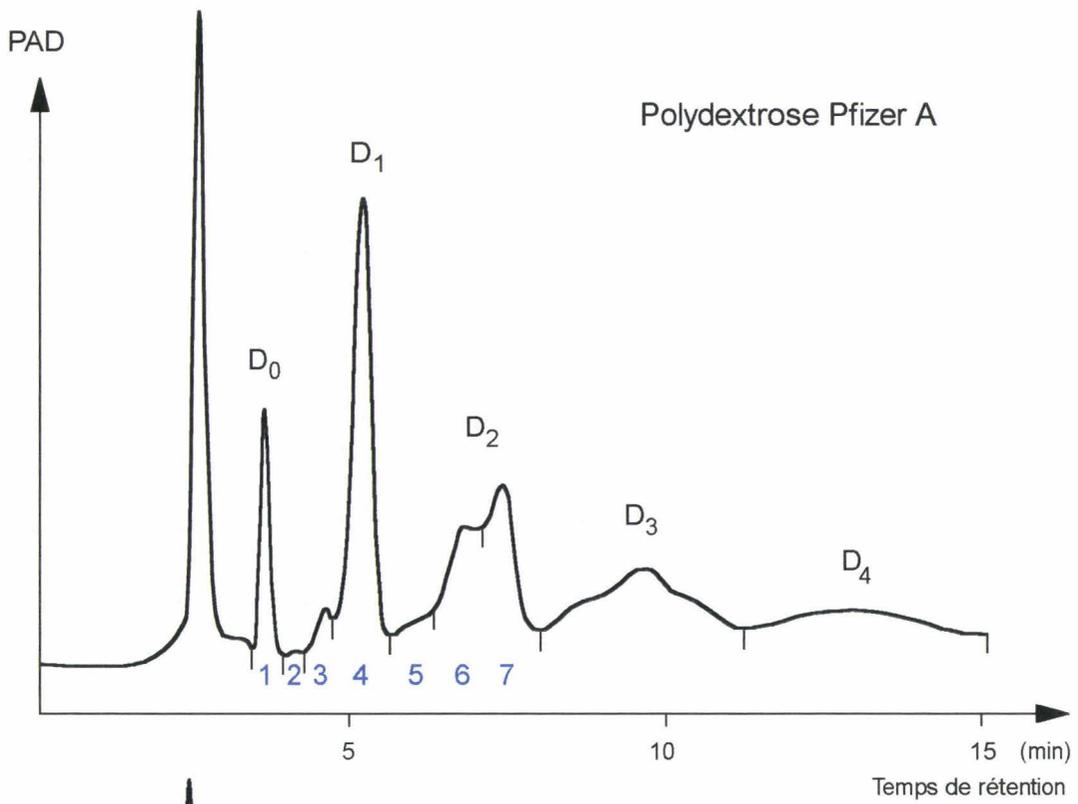


Figure 58: Fractionnements du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I sur colonne Diol

Tableau 35: Mise en évidence par spectrométrie de masse (MALD) des oligosaccharides présents dans les fractions et les sous-fractions obtenues par chromatographie sur colonne Diol du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I

Fraction	Sous-fraction	Polydextrose Pfizer A	Polyglucose Roquette I
<b>D<sub>0</sub></b>	1	<b>anhydroglc*</b>	<b>anhydroglc*</b>
<b>D<sub>1</sub></b>	2	anhydroglc	
		<b>glc-anhydroglc</b>	
	3	<b>glc-anhydroglc</b>	<b>glc-anhydroglc</b>
	4	glc	glc
		sorbitol	
		<b>glc-anhydroglc</b>	<b>glc-anhydroglc</b>
		(glc) <sub>2</sub>	(glc) <sub>2</sub>
<b>glc-sorbitol</b>			
	<b>(glc)<sub>2</sub>-anhydroglc</b>	<b>(glc)<sub>2</sub>-anhydroglc</b>	
<b>D<sub>2</sub></b>	5	glc-anhydroglc	
		(glc) <sub>2</sub>	
		glc-sorbitol	
		<b>(glc)<sub>2</sub>-anhydroglc</b>	
		(glc) <sub>3</sub>	
	6	<b>(glc)<sub>2</sub></b>	<b>(glc)<sub>2</sub></b>
		<b>glc-sorbitol</b>	
		(glc) <sub>2</sub> -anhydroglc	(glc) <sub>2</sub> -anhydroglc
		(glc) <sub>3</sub>	(glc) <sub>3</sub>
		(glc) <sub>3</sub> -anhydroglc	(glc) <sub>3</sub> -anhydroglc
	7	<b>(glc)<sub>2</sub></b>	(glc) <sub>3</sub> -anhydroglc
		<b>glc-sorbitol</b>	
<b>(glc)<sub>2</sub>-anhydroglc</b>		<b>(glc)<sub>2</sub>-anhydroglc</b>	
(glc) <sub>3</sub>		(glc) <sub>3</sub>	
(glc) <sub>2</sub> -sorbitol			
(glc) <sub>3</sub> -anhydroglc		(glc) <sub>3</sub> -anhydroglc	

\* les oligosaccharides écrits en gras sont les composés majoritaires.

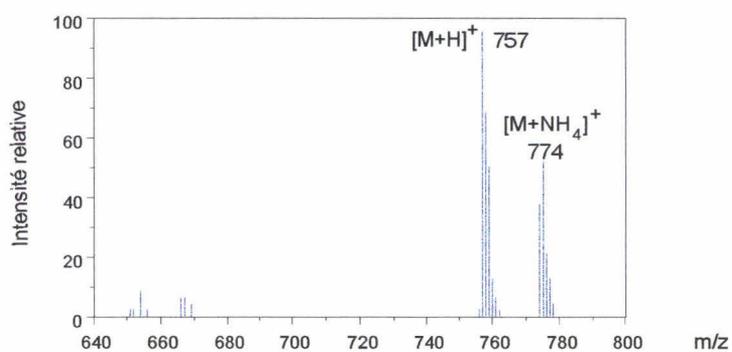
quantitatif exprimé dans ce Tableau par les composés notés en gras a été réalisé selon les éléments de réponse relatifs aux espèces réductrice, anhydro et alditol que nous possédons par MALD et par les analyses de chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés. On remarque que les sous-fractions n'ont pas permis d'isoler des composés purs et qu'elles sont encore constituées de mélange d'oligosaccharides de différents degrés de polymérisation et de nature chimique différente. N'ayant pas obtenu sur cette colonne un fractionnement du polydextrose par type de composé, les sous-fractions ont été regroupées comme dans le cas du polyglucose. Par conséquent, pour le polyglucose Roquette I, les composés DP2 glucose-anhydroglucose se retrouvent majoritairement dans la fraction D<sub>1</sub> et les disaccharides glucose-glucose dans la fraction D<sub>2</sub>. Concernant le polydextrose Pfizer A, les composés glucose-sorbitol ont été retrouvés en mélange avec les composés glucose-glucose dans la fraction D<sub>2</sub>.

Etant donné que l'isolement de chaque oligosaccharide et sa caractérisation dépassent le cadre de ce travail, nous avons choisi d'analyser prioritairement la totalité des DP2 c'est-à-dire les fractions D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> du polydextrose Pfizer A.

#### *Analyse de la fraction Diol D<sub>1</sub> enrichie en DP2 glucose-anhydroglucose*

La fraction D<sub>1</sub> triméthylsilylée du polydextrose Pfizer A a été analysée par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatogramme (Figure 59) montre un massif d'une quinzaine de pics. L'étude par spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique (NH<sub>3</sub>) du chromatogramme a montré que 13 pics donnent un ion à m/z 774 correspondant à l'espèce moléculaire [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> d'un disaccharides glucose-anhydroglucose. Si on pose comme hypothèse la présence d'un 1,6 anhydroglucopyranose dans le disaccharide, ce nombre élevé de pics correspond à toutes les possibilités de structure, c'est-à-dire les différentes possibilités de liaisons d'un résidu de glucose en (1-2), (1-3), (1-4), les anoméries de liaison α et β et la possibilité de cycle pyranique ou furanique. L'analyse GC/MS par impact électronique (EI) n'a pu nous fournir d'autres renseignements structuraux à cause du manque de témoin. La RMN du proton de la fraction D<sub>1</sub> comparée au spectre témoin du 1,6 anhydro-β-D-glucopyranose ne nous a pas apportée de renseignements.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les disaccharides possèdent un résidu 1,6 anhydroglucose, nous avons effectué une analyse par GC/MS en mode CI de la fraction D<sub>1</sub> réduite au KBD<sub>4</sub> et méthylée. Cette analyse vise à montrer l'inertie des disaccharides vis-à-vis



Spectre CI ( $NH_3$ ) du composé  
glucose-anhydroglucose triméthylsilylée ●

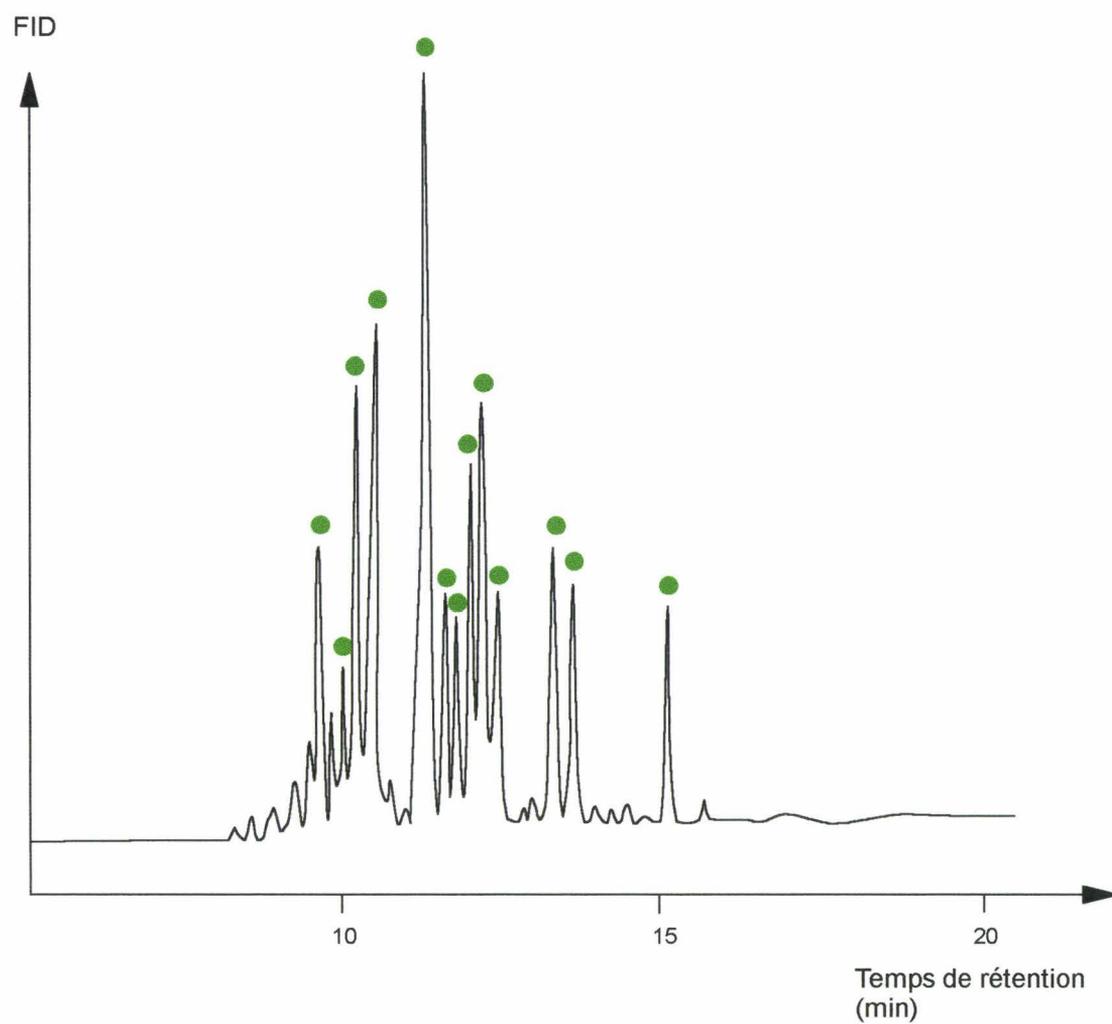


Figure 59: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>1</sub> triméthylsilylée  
du polydextrose Pfizer A

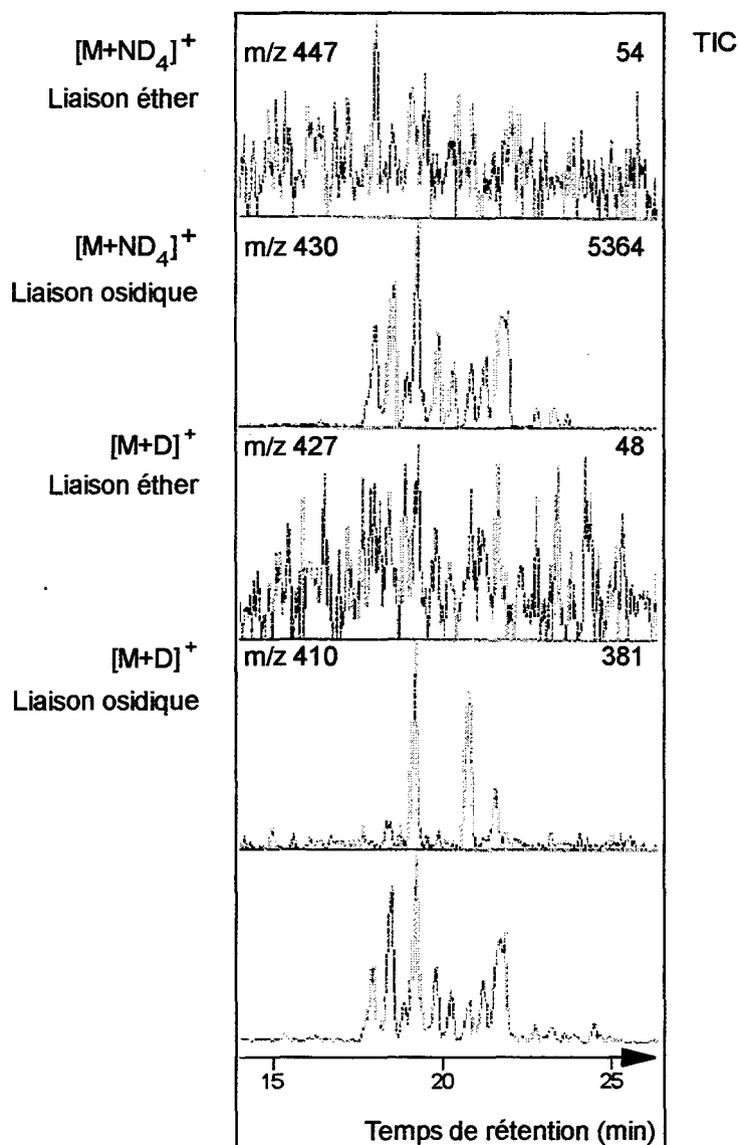


Figure 60: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>1</sub> du polydextrose Pfizer A, réduite (D) et méthylée  
Reconstitution sur les ions 410, 427, 430 et 447 obtenus par CI (ND<sub>3</sub>)

de la réduction ou la sensibilité. Dans ce dernier cas, nous pourrions mettre en évidence des éventuelles liaisons éthers. Le gaz réactant habituellement utilisé, l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), a été remplacé par de l'ammoniac deutéré ( $\text{ND}_3$ ) car la valeur de l'espèce moléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  d'une liaison éther correspondait à celle de l'espèce  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  d'une liaison osidique à  $m/z$  426 et cette ambiguïté ne nous permettait pas de conclure. Dans le cas d'une liaison osidique entre les deux résidus, le disaccharide ne possède pas de fonction réductrice et ne peut donc être réduit;  $[\text{M}+\text{D}]^+$  à  $m/z$  410 et  $[\text{M}+\text{ND}_4]^+$  à  $m/z$  430 sont les espèces moléculaires attendues (Tableau 36). Dans le cas d'une liaison éther, le disaccharide est réducteur et les espèces moléculaires correspondantes sont  $[\text{M}+\text{D}]^+$  à  $m/z$  427 et  $[\text{M}+\text{ND}_4]^+$  à  $m/z$  447. Une reconstitution du chromatogramme sur les ions 410, 427, 430 et 447 ne fait apparaître que l'ion  $[\text{M}+\text{D}]^+$  à  $m/z$  410 faible et l'ion  $[\text{M}+\text{ND}_4]^+$  à  $m/z$  430 intense caractéristiques d'une liaison osidique entre un résidu de glucose et un résidu de glucose dont le carbone 1 est engagé dans une liaison acétalique interne formant le pont anhydro (Figure 60).

Tableau 36: Espèces moléculaires attendues,  $[\text{M}+\text{D}]^+$  et  $[\text{M}+\text{ND}_4]^+$ , des composés glucose-anhydroglucose réduits (D) et méthylés liés par liaison osidique ou éther, lors d'une analyse GC/MS en CI( $\text{ND}_3$ ).

<b>glc-anhydroglc</b>	<b><math>[\text{M}+\text{D}]^+</math></b>	<b><math>[\text{M}+\text{ND}_4]^+</math></b>
liaison osidique	410	430
liaison éther	427	447

L'analyse par GC/MS en mode d'impact électronique (EI) de la fraction  $\text{D}_1$  réduite, méthanolysée et acétylée a servi à déterminer les points de branchement des disaccharides glucose-anhydroglucose. Dans la zone d'élution des dérivés diméthyl diacétyl O-méthyl glycosides, le chromatogramme montre la présence, confirmée par EI du 2,4 diméthyl 3,6 diacétyl, du 2,3 diméthyl 4,6 diacétyl et du 3,4 diméthyl 2,6 diacétyl O-méthyl glucopyranosides. Ces réactions produisent des dérivés diacétylés qui indiquent la position des substitutions et la position du pont acétalique mais sans faire de distinction. Deux hypothèses de structure sont alors possibles: présence de pont anhydro en 1, 2, 1,3 et 1,4 et substitution du glucose par une liaison en (1-6) ou pont anhydro en 1,6 et substitution du

glucose par des liaisons en (1-2), (1-3) et (1-4). Certes, la méthode ne permet pas de conclure en faveur de l'une ou de l'autre de ces hypothèses. La mise en évidence du 1,6 anhydroglucose libre dans les produits natifs ainsi que celle des résidus 1,6 anhydroglucose en position terminale dans des dextrines (Greenwood, 1967) sont deux éléments qui permettent de privilégier l'hypothèse des 1,6 anhydroglucoses alors substitués sur leurs hydroxyles encore libres.

Pour conclure, les disaccharides glucose-anhydroglucose possèdent donc les structures suivantes: glucose (1-2) anhydro-1,6-D-glucopyranose, glucose (1-3) anhydro-1,6-D-glucopyranose et glucose (1-4) anhydro-1,6-D-glucopyranose. La liaison osidique en (1-4) est majoritaire. Les anoméries de liaisons  $\alpha$  et  $\beta$  et la forme de cycle du glucose lié pyrane ou furane sont possibles.

#### ***Analyse de la fraction Diol D<sub>2</sub> enrichie en DP2 glucose-glucose et glucose-sorbitol***

Nous avons précédemment démontré par spectrométrie de masse MALD que la fraction D<sub>2</sub> du polydextrose Pfizer A obtenue par chromatographie sur colonne Diol était constituée principalement des composés glucose-glucose et glucose-sorbitol de degré de polymérisation 2. Cette fraction contient aussi des DP2 glucose-anhydroglucose et des DP supérieurs, DP3, (glc)<sub>3</sub>, (glc)<sub>2</sub>-sorbitol, et DP4, (glc)<sub>3</sub>-anhydroglucose.

Dans le but de réaliser la caractérisation des DP2 de cette fraction, la première étape a été de mettre en évidence sur le chromatogramme obtenu par GC/MS en mode d'ionisation chimique (NH<sub>3</sub>) de la fraction D2 triméthylsilylée les DP2 réducteurs et DP2 alditoles correspondant respectivement à l'espèce moléculaire [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z 936 et 1010 (Figure 61). Certains pics présentent des épaulements et nombreux sont ceux qui expriment les deux ions à m/z 936 et 1010 démontrant de nombreuses co-élutions. Ces conditions de séparation sont cependant les meilleures que nous ayons pu obtenir.

Afin d'attribuer chacun des pics correspondant aux disaccharides glucose-glucose, la série de témoins commerciaux composée des disaccharides liés en (1-1), (1-2), (1-3), (1-4) et (1-6) ont été triméthylsilylés et analysés seuls et en mélange par GC afin de leur attribuer un temps de rétention. Les temps de rétention obtenus ont été résumés dans le Tableau 37. Les analyses par spectrométrie de masse en mode CI(NH<sub>3</sub>) et EI de ces témoins nous ont permis, après

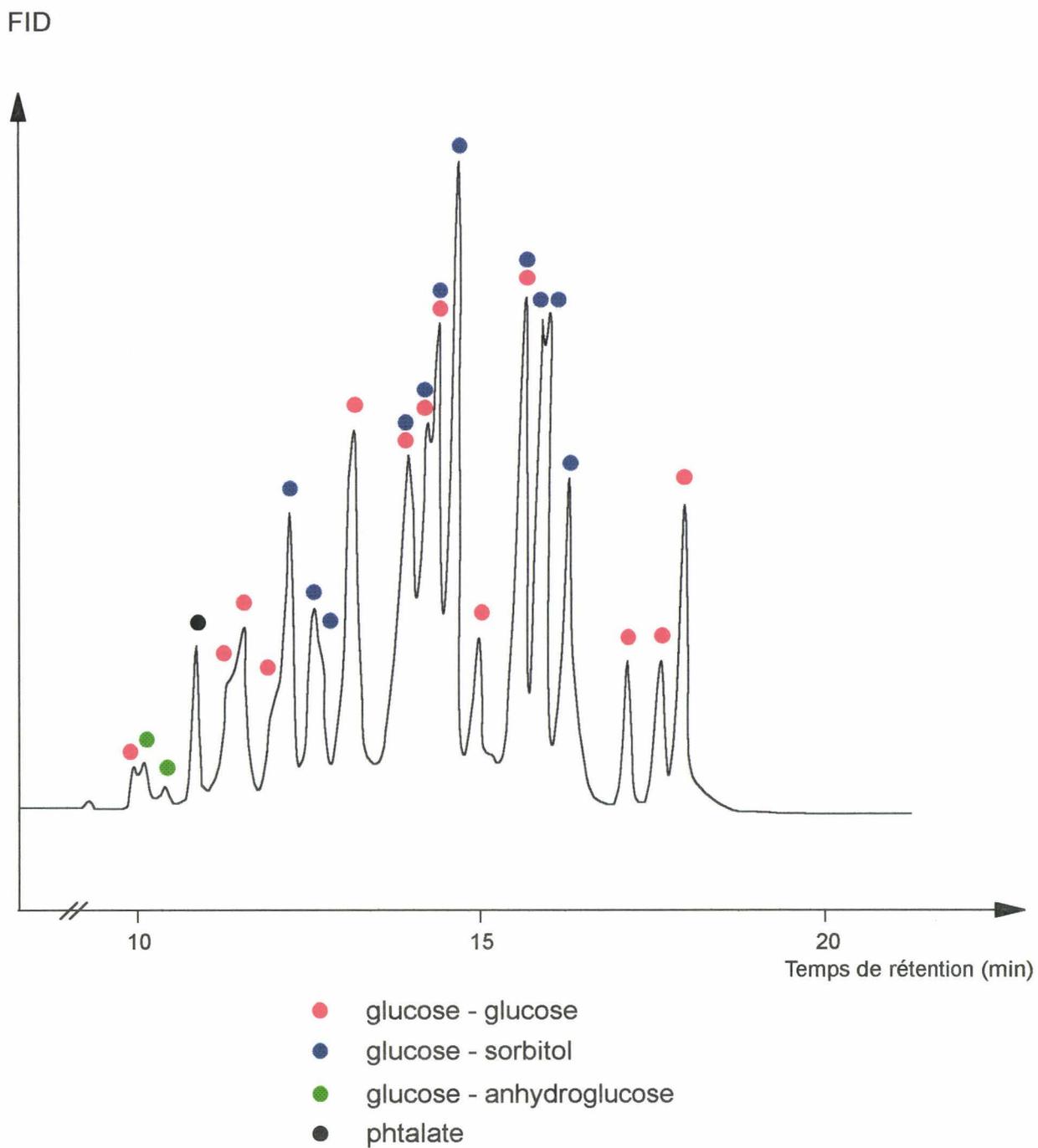


Figure 61: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>2</sub> triméthylsilylée du polydextrose Pfizer A  
Attribution des composés par CI (NH<sub>3</sub>)

FID

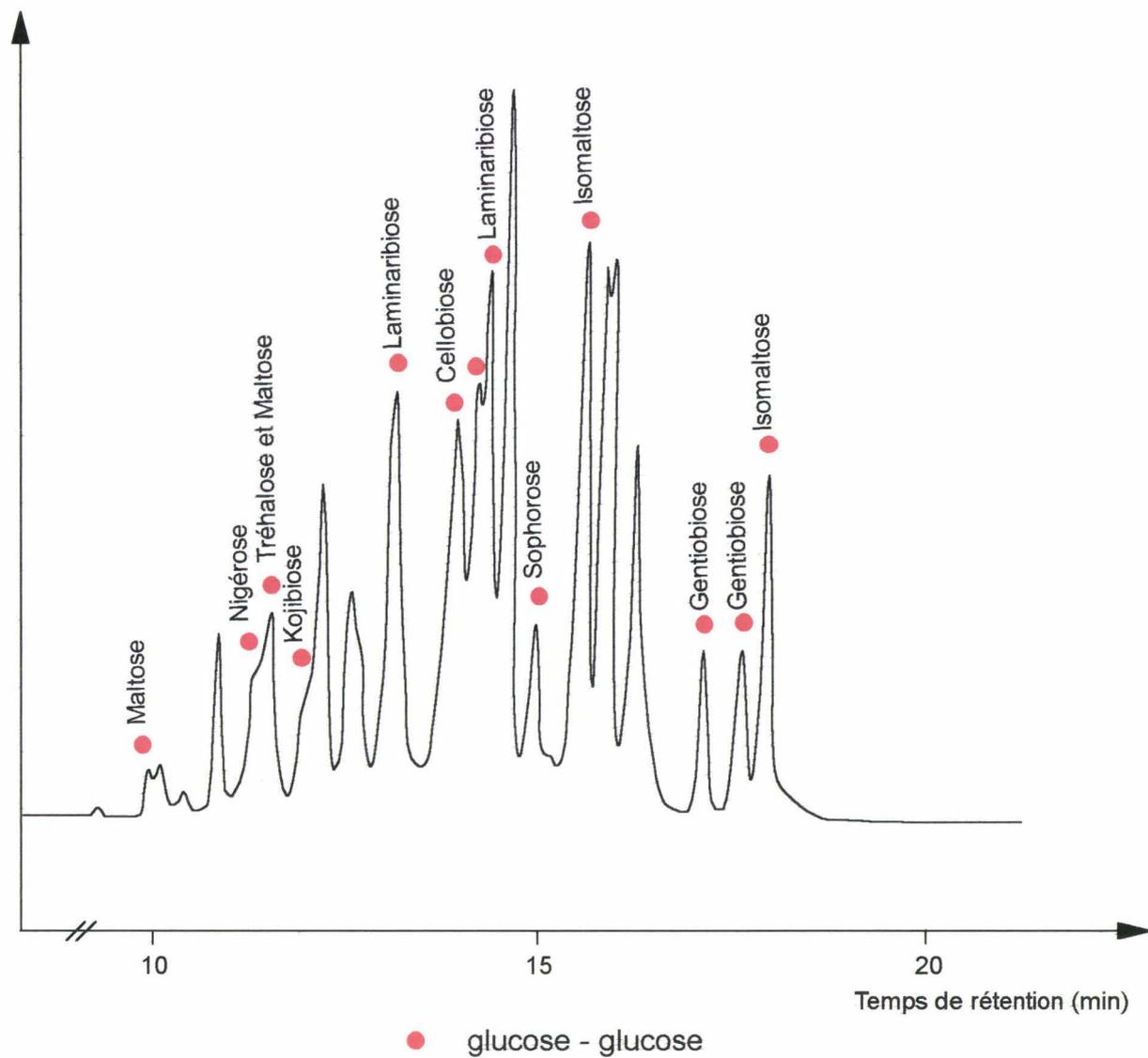
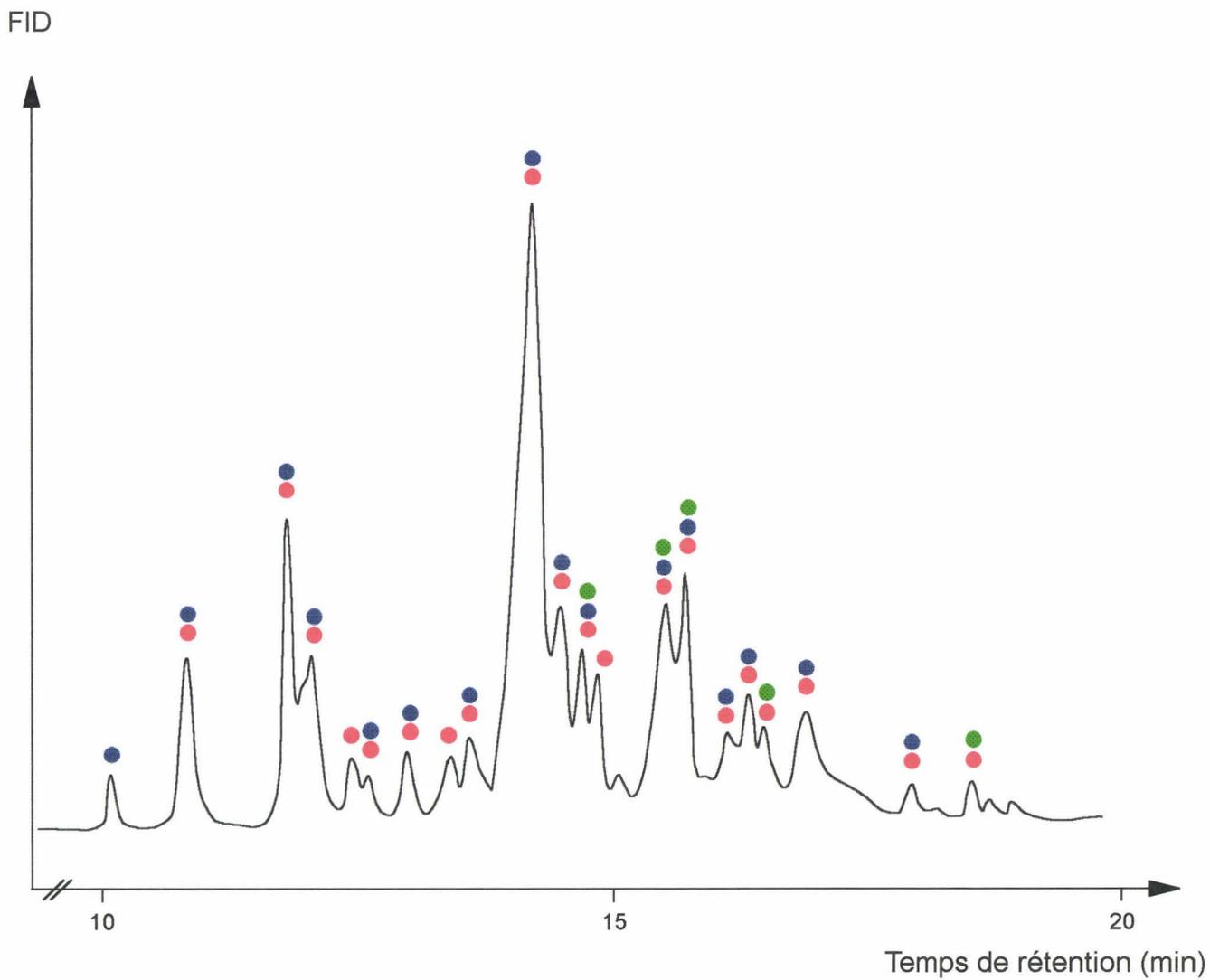


Figure 62: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>2</sub> triméthylsilylée du polydextrose Pfizer A  
Attribution des composés glucose - glucose

vérification des espèces moléculaires  $[M+H]^+$  et  $[M+NH_4]^+$ , d'attribuer les fragments caractéristiques de chacun des composés. Les ions fragments produits par EI des dérivés triméthylsilylés sont obtenus à  $m/z$  565 pour le tréhalose,  $m/z$  583 pour les liaisons en (1-6),  $m/z$  578 et 668 pour les liaisons en (1-4) et (1-2), et à  $m/z$  668 avec absence de l'ion à  $m/z$  578 pour les liaisons en (1-3). Pour différencier les disaccharides possédant la même liaison mais une anomérie  $\alpha$  ou  $\beta$ , il nous a fallu tenir compte de l'intensité relative des ions respectifs. La fragmentation en EI des composés triméthylsilylés est difficile à interpréter. Pourtant la combinaison des trois paramètres, temps de rétention, fragments caractéristiques et intensité relative des fragments, nous a permis de comparer les résultats obtenus avec les témoins et d'attribuer les composés de la fraction D<sub>2</sub> triméthylsilylée. La Figure 62 représente le chromatogramme obtenu de la fraction Diol D<sub>2</sub> triméthylsilylée du polydextrose Pfizer A et tous les composés du Tableau 37 identifiés. Certains composés se présentent sur le chromatogramme en deux pics distincts, par exemple le maltose. Il s'agit des deux formes anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du glucose terminal.

Pour l'attribution des disaccharides glucose-sorbitol, la même stratégie a été appliquée à des témoins qui ont été préparés par réduction au KBD<sub>4</sub> des disaccharides glucose-glucose commerciaux. L'analyse des témoins réduits (D) et triméthylsilylés seuls puis en mélange par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en EI ne nous a pas permis d'attribuer de façon satisfaisante des temps de rétention et des fragments caractéristiques. En effet, les résidus de sorbitol des disaccharides triméthylsilylés sont très sensibles à une désilylation rendant la fragmentation en EI très difficile à interpréter. Pour cette raison, nous avons alors choisi d'analyser les composés méthylés (Figure 63) plus stables lors des analyses en impact électronique. Le témoin leucrose, de structure glucose  $\alpha(1-5)$  fructose, a été réduit (D) car il permet l'obtention du glucose  $\alpha(1-5)$  sorbitol(D) et du glucose  $\alpha(1-5)$  maltitol(D). Le premier composé est celui qui nous intéresse, il est caractéristique d'une liaison en 5 sur le sorbitol. Les temps de rétention ont été attribués à l'issue de l'analyse par GC des témoins réduits (D) et méthylés (Tableau 38). La comparaison des temps de rétention de la fraction D<sub>2</sub> méthylée avec ceux des standards permet de suspecter quelques produits mais d'attribuer seulement deux disaccharides de façon certaine, le glucose  $\alpha(1-6)$  sorbitol et le glucose  $\beta(1-6)$  sorbitol (Figure 64). Ces résultats ont été confirmés par CI et EI. D'autres composés ont été suspectés dans la fraction mais les co-élutions et la faible quantité de certains produits ont empêché leur identification sans équivoque.



- glucose - glucose
- glucose - sorbitol
- glucose - anhydroglucose

Figure 63: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>2</sub> méthylée du polydextrose Pfizer A  
 Attribution des composés par CI (NH<sub>3</sub>)

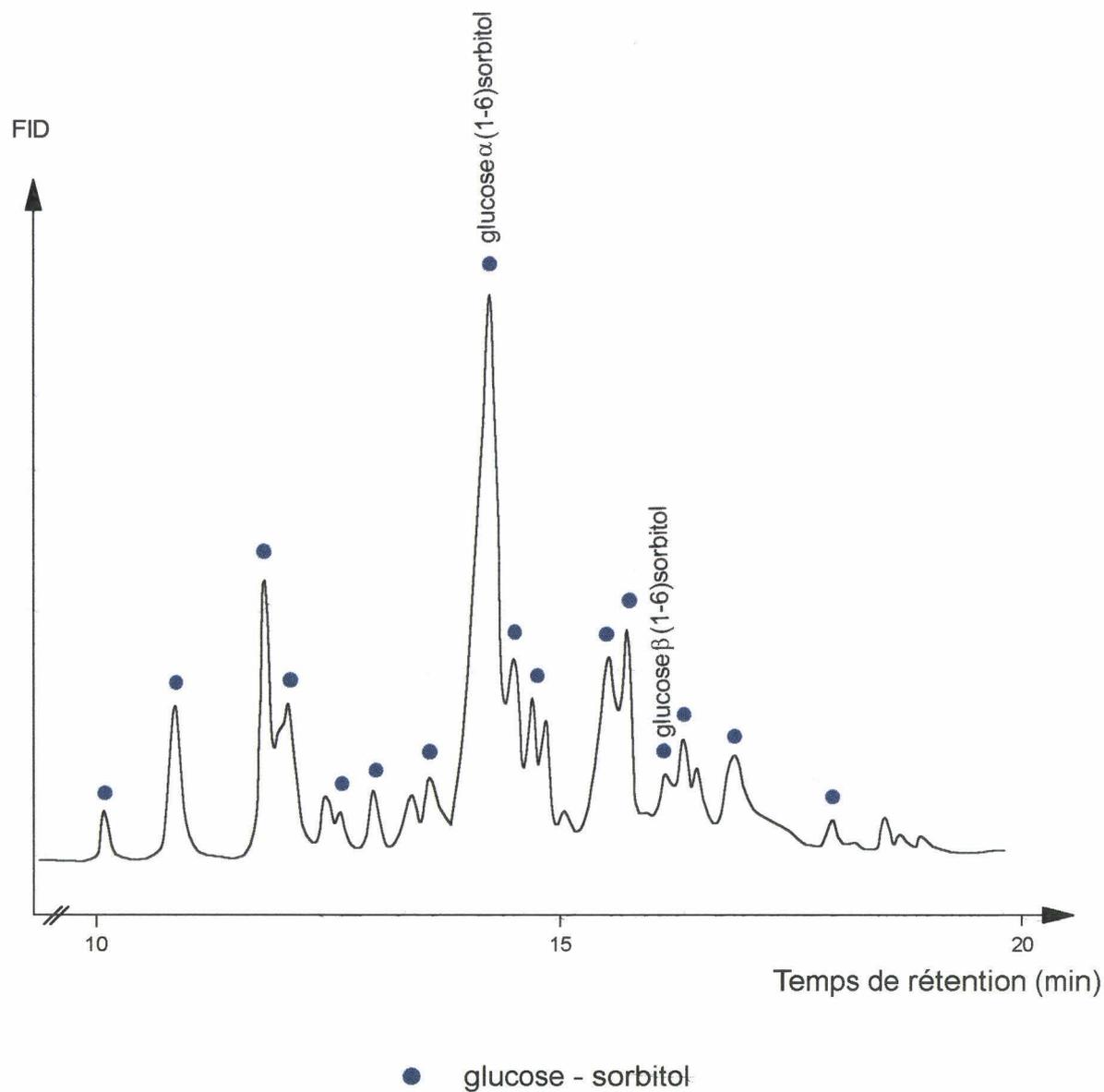


Figure 64: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>2</sub> méthylée du polydextrose Pfizer A  
 Attribution des composés glucose - sorbitol par CI (NH<sub>3</sub>)

Tableau 37: Temps de rétention obtenus en GC des disaccharides témoins glucose-glucose triméthylsilylés

Disaccharide	Liaison	Temps de rétention (min)
Tréhalose	$\alpha(1-1)$	11,23
Kojibiose	$\alpha(1-2)$	12,02
Sophorose	$\beta(1-2)$	14,59
Nigérose	$\alpha(1-3)$	11,10
Laminaribiose	$\beta(1-3)$	13,09 et 14,20*
Maltose	$\alpha(1-4)$	10,09 et 11,33*
Cellobiose	$\beta(1-4)$	13,56
Isomaltose	$\alpha(1-6)$	15,38 et 17,58*
Gentiobiose	$\beta(1-6)$	17,11 et 17,38*

\*les deux temps de rétention correspondent aux anomères  $\alpha$  et  $\beta$ .

Tableau 38: Temps de rétention obtenus par GC des disaccharides témoins glucose-sorbitol méthylés

Disaccharide	Liaison	Temps de rétention (min)
Isomaltose	$\alpha(1-6)$	14,09
Gentiobiose	$\beta(1-6)$	16,03
Sophorose	$\beta(1-2)$	12,12
Leucrose	$\alpha(1-5)$	11,33
glucose $\alpha(1-5)$ fructose		11,56
Nigérose	$\alpha(1-3)$	11,03
Laminaribiose	$\beta(1-3)$	11,20
Maltose	$\alpha(1-4)$	11,10
Cellobiose	$\beta(1-4)$	11,06

Afin de déterminer la présence éventuelle de liaisons éthers, la fraction D<sub>2</sub> a été réduite au KBD<sub>4</sub> et méthylée comme cela avait été fait pour la fraction D<sub>1</sub>. La susceptibilité des composés vis-à-vis de la réduction permet de différencier les produits qui possèdent une liaison osidique ou une liaison éther par méthylation puis analyse des composés réduits méthylés obtenus par GC/MS en CI(ND<sub>3</sub>). Le Tableau 39 résume les valeurs des espèces moléculaires [M+D]<sup>+</sup> et [M+ND<sub>4</sub>]<sup>+</sup> attendues dans les différents cas possibles. Le chromatogramme résultant de l'analyse de la fraction D<sub>2</sub> par GC/MS en mode CI(ND<sub>3</sub>) a subi une reconstitution pour les disaccharides glucose-glucose (Figure 65) sur les espèces moléculaires [M+ND<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z 493 dans le cas d'une liaison osidique, à 510 dans le cas d'une liaison éther et à 476 pour le tréhalose. De même pour les disaccharides glucose-sorbitol, la reconstitution (Figure 66) a été réalisée sur les espèces [M+ND<sub>4</sub>]<sup>+</sup> à m/z 492 pour une liaison osidique et à 509 pour une liaison éther. Les seuls ions détectés sont à m/z 492, 493 et 476 démontrant ainsi que les disaccharides glucose-glucose et glucose-sorbitol sont uniquement liés par des liaisons osidiques.

Une confirmation de l'absence de liaison éther a été apportée par hydrolyse par l'acide trifluoroacétique (ATFA, 4 M, 4heures, 100°C) et l'analyse du milieu réactionnel par MALD. Aucun disaccharide n'a été observé dans les fractions D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> du polydextrose Pfizer A traitées.

Tableau 39: Espèces moléculaires attendues, [M+D]<sup>+</sup> et [M+ND<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, des composés glucose-glucose et glucose-sorbitol après réduction (D) et méthylation en fonction du type de liaison, lors d'une analyse par GC/MS en CI(ND<sub>3</sub>).

<b>glucose-glucose</b>	<b>espèce méthylée</b>	<b>[M+D]<sup>+</sup></b>	<b>[M+ND<sub>4</sub>]<sup>+</sup></b>
tréhalose α1, α1	tréhalose	456	476
liaison osidique	glc-glc <sup>itol</sup> (D)	473	493
liaison éther	glc <sup>itol</sup> (D)-glc <sup>itol</sup> (D)	490	510

<b>glucose-sorbitol</b>	<b>espèce méthylée</b>	<b>[M+D]<sup>+</sup></b>	<b>[M+ND<sub>4</sub>]<sup>+</sup></b>
liaison osidique	glc-sorbitol	472	492
liaison éther	glc <sup>itol</sup> (D)-sorbitol	489	509

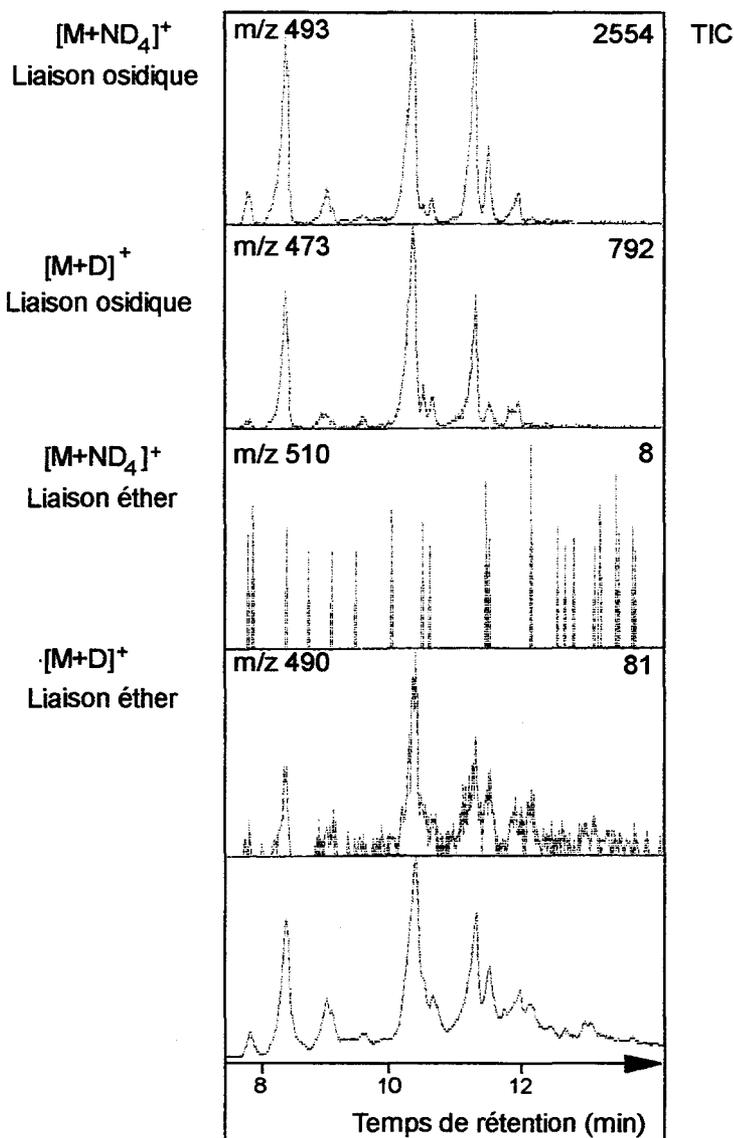


Figure 65: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>2</sub> du polydextrose Pfizer A, réduite (D) et méthylée  
 Reconstitution sur les ions 493, 493, 490, 510 obtenus par CI(ND<sub>3</sub>)  
 des composés glucose-glucose liés par liaison osidique ou éther

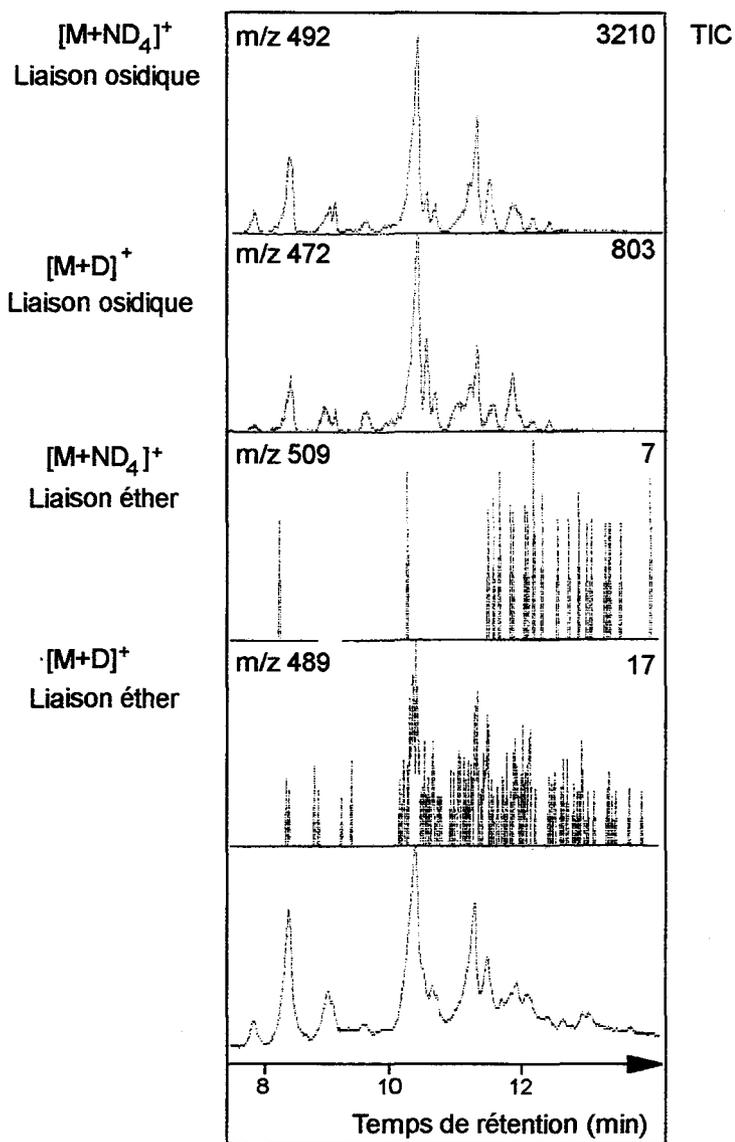


Figure 66: Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction D<sub>2</sub> du polydextrose Pfizer A, réduite (D) et méthylée  
 Reconstitution sur les ions 472, 492, 489 et 509 obtenus par CI(ND<sub>3</sub>)  
 des composés glucose-sorbitol liés par liaison osidique ou éther

Pour conclure, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur une colonne Diol du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I a été réalisée dans le but de fractionner ces polymères glucidiques en fonction de leur degré de polymérisation afin d'en déterminer la structure fine. La spectrométrie de masse par MALD a démontré que les fractions obtenues n'étaient pas pures c'est-à-dire ne contenaient pas un seul degré de polymérisation. Cependant les fractions D<sub>1</sub> du polyglucose Roquette I et du polydextrose Pfizer A sont fortement enrichies en DP2 glucose-anhydroglucose. La fraction D<sub>2</sub> du polyglucose Roquette I est fortement enrichie en DP2 glucose-glucose alors que la fraction D<sub>2</sub> issue du polydextrose Pfizer A est constituée des DP2 glucose-glucose et glucose-sorbitol en mélange. Ces fractions sont encore contaminées par des composés de nature chimique différente, glucose, anhydroglucose ou sorbitol, et/ou de degrés de polymérisation supérieurs.

Dans l'objectif de caractériser les DP2, nous avons abordé l'analyse structurale de la totalité des DP2 du polydextrose Pfizer A des fractions D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>.

La fraction D<sub>1</sub> triméthylsilylée et analysée par GC/MS en CI(NH<sub>3</sub>) a montré la présence de 13 composés correspondant aux DP2 glucose-anhydroglucose par comparaison avec des produits témoins. L'analyse de la fraction réduite (D) et méthylée par GC/MS en CI(ND<sub>3</sub>) a ensuite démontré que la liaison entre les deux résidus monosaccharidiques est de type osidique en (1-2), (1-3) et (1-4) sur un anhydroglucose avec une liaison acétalique interne en 1,6. La position en 6 étant engagée dans le pont anhydro, la liaison osidique en (1-4) est préférentielle. Aucune liaison de type éther n'a pu être mise en évidence dans cette fraction.

De la même façon, la fraction D<sub>2</sub> triméthylsilylée a été analysée par GC/MS en CI(NH<sub>3</sub>). Les liaisons en (1-2), (1-3), (1-4) et (1-6) des disaccharides glucose-glucose ont été identifiées ainsi que les anoméries de liaison glycosidiques  $\alpha$  et  $\beta$  et le tréhalose. Cependant, seuls les disaccharides alditols, glucose  $\alpha$ (1-6) sorbitol et glucose  $\beta$ (1-6) sorbitol ont été caractérisés par GC/MS en CI de la fraction méthylée par comparaison avec les témoins réduits (D) et méthylés. Aucune liaison éther n'a pu être mise en évidence par réduction (D) et méthylation de cette fraction et par analyse GC/MS en CI(ND<sub>3</sub>). Les disaccharides glucose-glucose et glucose-sorbitol sont donc liés uniquement par des liaisons osidiques.

Une analyse structurale détaillée des autres fractions Diol, D<sub>3</sub> et D<sub>4</sub>, n'a pas été envisagée à la vue des résultats précédents et cela pour plusieurs raisons. D'une part, ces fractions sont des mélanges de plus en plus hétérogènes de mélanges de familles (glucose, sorbitol et/ou anhydroglucose) et de degrés de polymérisation supérieurs. Leur analyse se complique encore avec l'hétérogénéité croissante des fractions étant donné le nombre de possibilités de

structures qui augmente ne serait-ce que lorsque l'on choisit d'étudier les trisaccharides. D'autre part, l'analyse de ces fractions ne nous apportera certainement pas plus de renseignements car elles renferment des oligosaccharides possédant toutes les possibilités structurales de liaisons, d'anomérisation et de taille de cycle comme les fractions D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>.

Ces résultats démontrent et confirment l'extrême hétérogénéité de structure d'un polymère issu de polycondensation. Cette hétérogénéité semble refléter un mécanisme aléatoire mais elle est en fait représentative de la réactivité des fonctions chimiques en présence lors de la réaction. Pour le polydextrose Pfizer A, les résultats obtenus avec les disaccharides glucose-glucose et glucose-anhydroglucose sont en accord avec la réactivité des fonctions hydroxylées du glucose qui est décroissante dans l'ordre 6, 4, 3, 2 et 1. Pour les composés glucose-sorbitol, seuls les liaisons en (1-6) ont été identifiées; en effet les fonctions alcool primaire en 1 et en 6 sont les plus réactives de la molécule de sorbitol. Pour le polyglucose Roquette I, seuls les composés glucose-glucose et glucose-anhydroglucose ont été identifiés. L'hétérogénéité de structure répond aux mêmes critères.

### Fractionnement par amination réductive des oligosaccharides réducteurs

La réaction d'amination réductive a été appliquée aux oligosaccharides du polydextrose Pfizer A et au polyglucose Roquette I. Un marquage sélectif des fonctions réductrices au 2-aminobenzamide (2AB) selon le schéma réactionnel présenté dans nos généralités, permet une approche différente du fractionnement des polymères glucidiques. La stratégie a pour but l'isolement des différentes familles décrites dans ces polymères glucidiques et leur caractérisation analytique et semi-quantitative.

#### *Présentation de la stratégie* (Figure 67)

La première étape consiste en un marquage spécifique au 2AB des oligosaccharides réducteurs suivi de deux étapes de purification des dérivés marqués, par extraction au CHCl<sub>3</sub> puis par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse sur une colonne de C18. Les oligosaccharides-2AB purifiés sont ensuite caractérisés par spectrométrie de masse. La fraction collectée au volume mort de la colonne contient les composés non réducteurs, principalement les (glc)<sub>n</sub>-anhydroglucose et les (glc)<sub>n</sub>-sorbitol. Le fractionnement selon le même protocole des (glc)<sub>n</sub>-anhydroglucose demande une étape

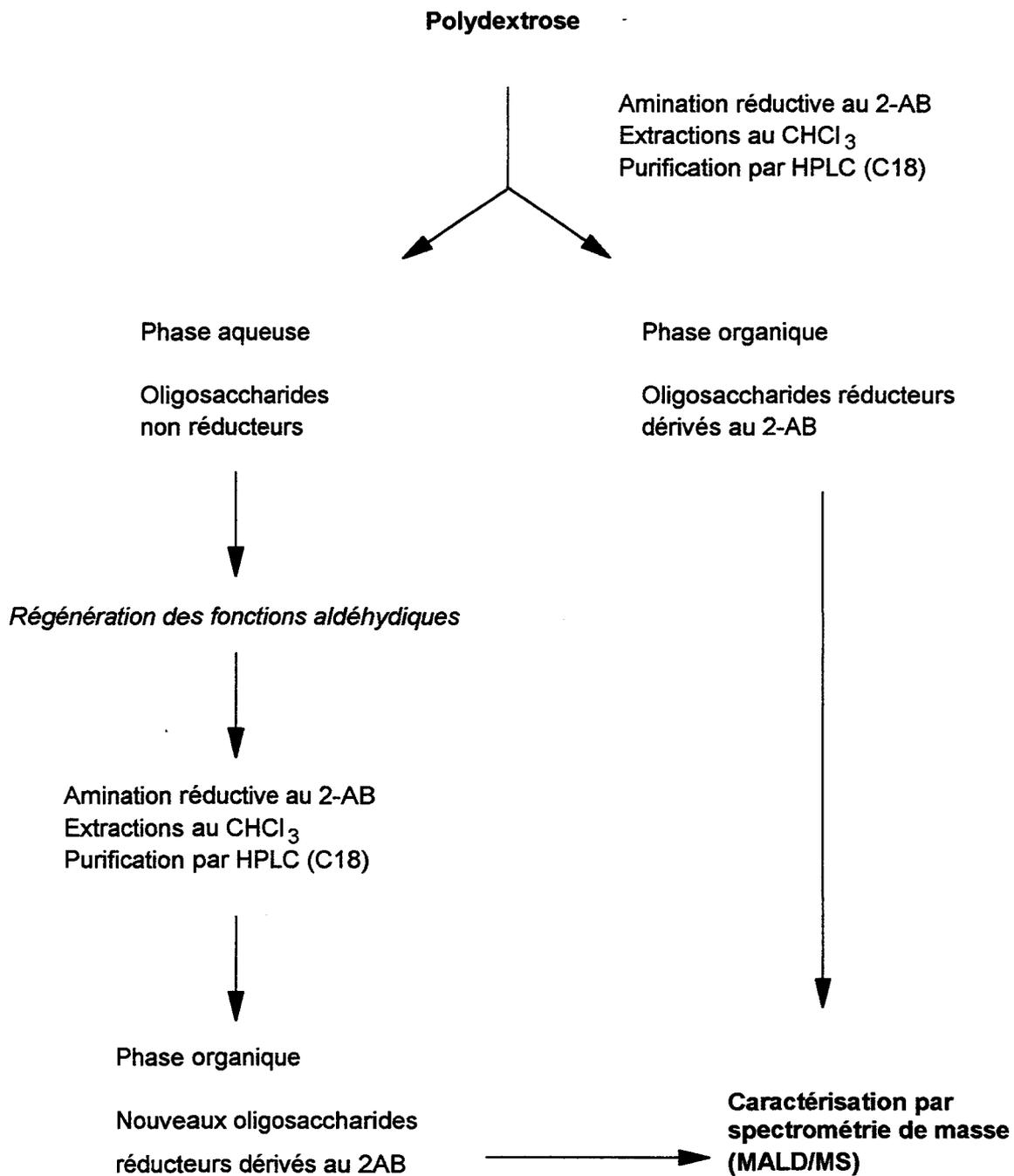


Figure 67 : Stratégie de séparation des différentes familles d'oligosaccharides du polydextrose Pfizer A par dérivation des oligosaccharides réducteurs par amination réductive au 2-AB et purification par HPLC sur colonne C18

préalable de régénération de la fonction aldéhydique des anhydroglucoses terminaux afin de pouvoir être marqués par amination réductive. Cette étape de régénération de la fonction aldéhydique est délicate car elle se déroule en présence d'une grande quantité de borates issus du milieu réactionnel de l'amination réductive. Après régénération d'une fonction aldéhydique sur les composés  $(\text{glc})_n$ -sorbitol, une dernière étape nous permettrait d'isoler les oligosaccharides alditols marqués au 2AB. De cette façon, les trois familles de composés pourraient être analysées séparément par spectrométrie de masse sous forme d'oligosaccharides dérivés au 2AB. Parmi les composés de nature glucose-HMF, glucose-acide lévulinique, sorbitol-HMF et sorbitol-acide lévulinique, certains sont susceptibles de posséder une fonction aldéhydique ou cétonique pouvant réagir avec le 2AB. Ces composés seront recherchés dans la fraction des homoglucooses dérivés au 2AB obtenue lors de la première étape de la stratégie.

Une approche analytique peut être menée sur chacune des fractions ainsi qu'une approche semi-quantitative car tous les composés dérivés au 2AB possèdent le même coefficient de réponse.

#### ***Rendement de la réaction d'amination réductive***

Avant d'appliquer cette stratégie aux polymères glucidiques dans le but d'une caractérisation semi-quantitative, il fallait nous assurer que les fractions oligosaccharidiques marquées au 2AB que nous allons successivement obtenir étaient bien représentatives de la distribution du produit initial. La notion de rendement est très importante pour deux raisons. D'une part, un mauvais rendement au niveau de la première étape entraînerait des oligosaccharides réducteurs non dérivés dans la fraction  $(\text{glc})_n$ -anhydroglucose et  $(\text{glc})_n$ -sorbitol. D'autre part, il faut que le rendement de la réaction soit identique pour tous les oligosaccharides de la fraction afin de ne pas contrarier la distribution glucidique initiale du polymère.

Dans le but d'estimer le rendement de la réaction d'amination réductive, une première approche a été réalisée en quantifiant par chromatographie en phase gazeuse (GC) la quantité d'oligosaccharide réducteur traitée par amination réductive et la quantité d'oligosaccharide marqué au 2AB collectée lors de l'élution à l'acétonitrile sur la colonne de C18. Les témoins utilisés ont été les maltooligosaccharides de DP2, 4 et 7. La Figure 68 montre le chromatogramme obtenu avec l'oligosaccharide de DP4, le DP4-2AB est élué à 22% en acétonitrile contenant 0,01% d'ATFA. La fraction contenant le DP4-2AB a été collectée et

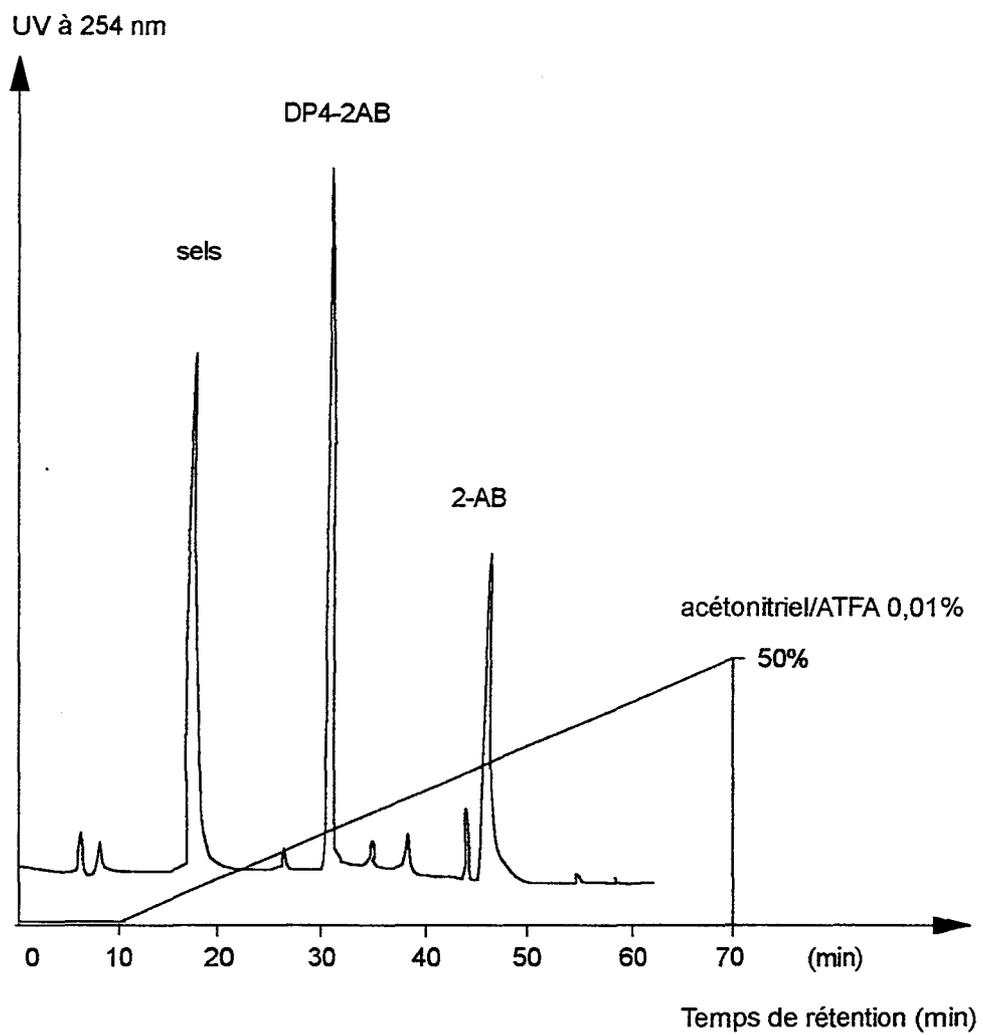


Figure 68: Purification par HPLC sur une colonne C18 du maltooligosaccharide de DP4 dérivé au 2-AB

analysée par GC après introduction du mésoinositol comme standard interne, méthanolyse et triméthylsilylation. Lors du calcul de la quantité de sucre, l'oligosaccharide dérivé au 2AB est exprimé en homoglucose et corrigé d'un facteur 2/1 pour le DP2, 4/3 pour le DP4 et 7/6 pour le DP7. Ce facteur correcteur s'explique par le fait que le motif glucose terminal réducteur dérivé au 2AB n'est pas rendu suffisamment volatile par triméthylsilylation pour être élué de la colonne. L'intégration de la surface des pics correspondant au glucose n'est donc représentative pour cet exemple que de 50 % de la teneur réelle en glucose de l'oligosaccharide dérivé d'où le facteur de correction égal à 2. De cette façon, les rendements obtenus avec les DP2, 4 et 7 sont de l'ordre de 80 à 85%. Il faut mentionner que cette estimation tient compte des rendements des différentes étapes dont la réaction d'amination réductive, les extractions au  $\text{CHCl}_3$ , la purification par chromatographie sur C18 et la concentration au rotavapor.

Malgré un rendement global de réaction très bon, il était important pour notre étude d'estimer le rendement réel de la réaction d'amination réductive. Pour cela, des échantillons de DP2, 4 et 7 ayant subi la réaction d'amination réductive puis les extractions au chloroforme ont été injectés sur la colonne C18. Le volume mort de la colonne (contenant les oligosaccharides non dérivés) et les oligosaccharides marqués au 2AB élués par le gradient d'acétonitrile ont été collectés. La présence de borates avec les oligosaccharides natifs et la présence d'acétonitrile et d'ATFA avec les oligosaccharides dérivés nous ont obligé à faire subir aux deux fractions, une étape de concentration au rotavapor pour éliminer l'ATFA et l'ACN), une peracétylation acide suivie d'extractions  $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  pour éliminer les borates avant de réaliser le dosage par GC comme décrit précédemment. Les rendements obtenus pour les trois oligosaccharides sont tout à fait comparables. L'oligosaccharide dérivé représente  $97 \pm 0,3$  % et l'oligosaccharide non dérivé  $3 \pm 0,3$  %. Par manque de témoin oligosaccharidique de DP supérieur à 7, la vérification du rendement des plus hauts DP n'a pu être réalisée. Etant donné que le protocole de la réaction définit un excès de 1 mole d'oligosaccharide pour 40 moles de 2AB pour un disaccharide et que cet excès s'amplifie encore lorsque la taille de l'oligosaccharide augmente, nous supposons que le rendement ne sera pas inférieur à celui déterminé pour les oligosaccharides précédents.

D'autre part, les extractions au chloroforme qui nous servent à éliminer le 2AB en excès dans le milieu réactionnel était une étape où nous pouvions perdre des oligosaccharides. En effet, le 2AB hydrophobe est soluble dans le chloroforme et les oligosaccharides natifs hydrophiles solubles dans l'eau, les oligosaccharides dérivés possèdent donc potentiellement

les deux caractères. Il fallait donc s'assurer que tous les oligosaccharides marqués, quelque soit leur taille, se retrouvaient dans la phase aqueuse afin d'éviter toute ségrégation d'oligosaccharides pouvant contrarier la répartition glucidique initiale ou alors vérifier que les pertes étaient équivalentes. Pour ce faire, les phases chloroformiques des lavages des milieux d'amination réductive des DP2, 4 et 7 précédents ont servi à estimer la quantité d'oligosaccharides dérivés qu'elle contenait. Pour cela, les phases chloroformiques ont été séchées et l'excès de 2AB qu'elles renferment éliminé par une chromatographie ascendante sur papier. Une injection en phase inverse de la phase dite chloroformique puis une comparaison de la surface de pic correspondant à la phase aqueuse de la réaction d'amination réductive nous a permis d'estimer les pertes d'oligosaccharides dérivés dues aux extractions. Les résultats montrent que les pertes sont inférieures à 1% et indépendantes de la taille de l'oligosaccharide.

Par ces analyses préliminaires, nous avons vérifié que la stratégie de fractionnement par marquage au 2AB nous permettait effectivement d'obtenir une répartition glucidique en homoglucose dérivés représentative du produit natif.

### ***Fractionnement des polymères glucidiques***

Le chromatogramme obtenu par HPLC sur colonne C18 lors de la purification des oligosaccharides réducteurs marqués au 2AB du polydextrose Pfizer A (Figure 69) montre les différents produits issus de la réaction. Au volume mort de la colonne, non détectés à 254 nm, sont élués les sels (borates) et les oligosaccharides non dérivés c'est-à-dire les oligosaccharides ayant un 1,6 anhydroglucose ou un sorbitol en position terminale réductrice. Suivant le gradient en acétonitrile croissant, le premier pic est un complexe résiduel entre le sel et le 2AB, le massif de pics correspond à l'ensemble des oligosaccharides dérivés au 2AB et le dernier à excès de 2AB non éliminé lors des extractions au chloroforme.

L'étude préliminaire du rendement réalisée avec les maltooligosaccharides témoins dérivés au 2AB, nous a permis de déterminer l'ordre d'élution des produits. Le glucose-2AB est élué le premier, avant les autres oligosaccharides dérivés. Il a un comportement particulier qui peut s'expliquer par la perte de sa structure cyclique au cours de l'étape de réduction. Les DP7 à 2 marqués au 2AB sont élués de façon prévisible car ils présentent un caractère hydrophile décroissant qui demande une augmentation du pourcentage en acétonitrile pour leur élution. Les oligosaccharides dérivés du polydextrose Pfizer A sont donc élués dans l'ordre décroissant de leur DP mais sous forme d'un massif à cause de la grande hétérogénéité

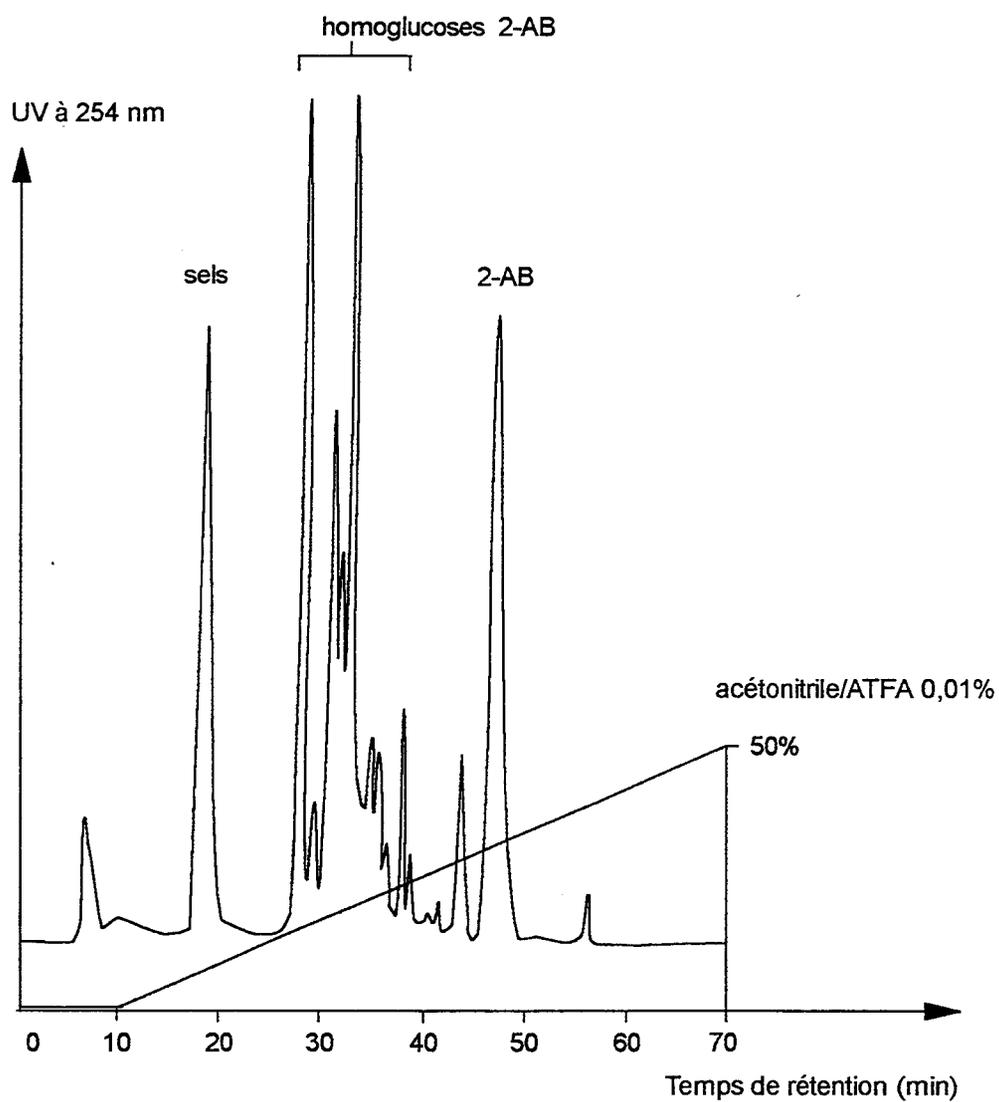


Figure 69: Purification par HPLC sur une colonne C18 du Polydextrose Pfizer A dérivé au 2-AB

Intensité relative

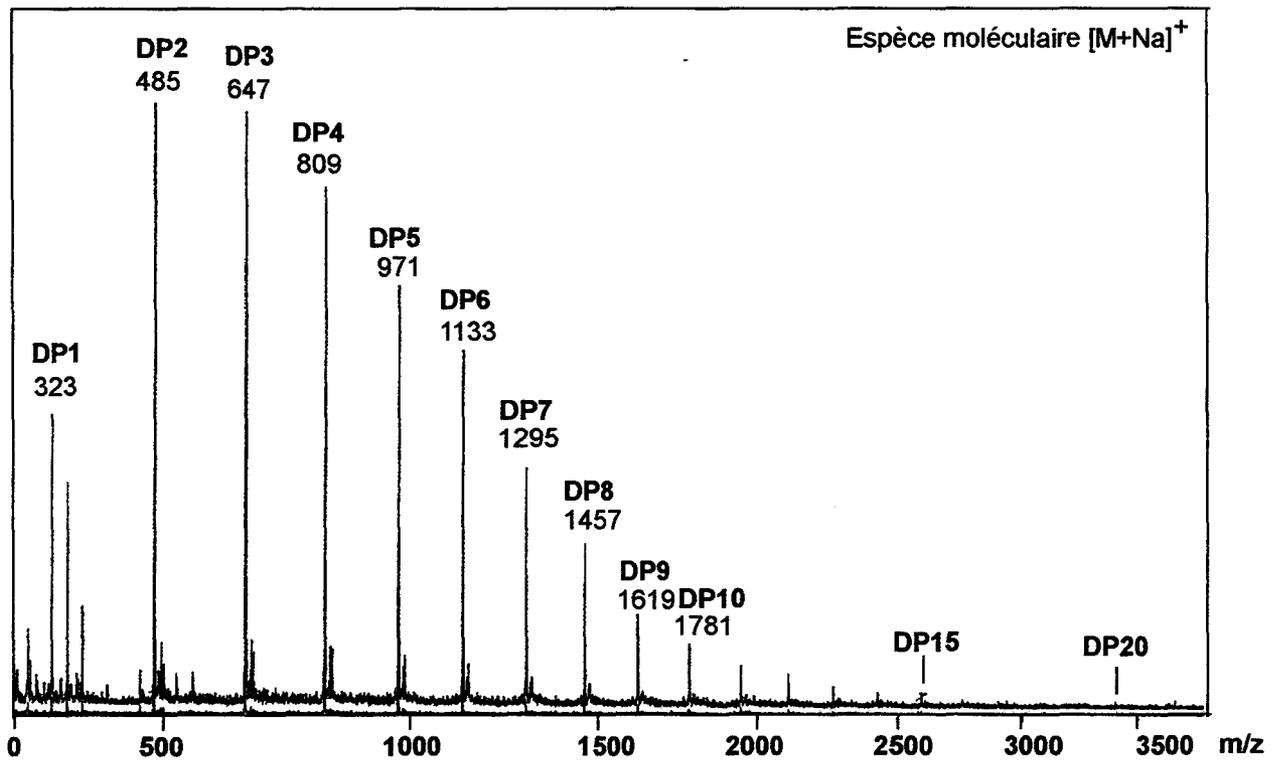


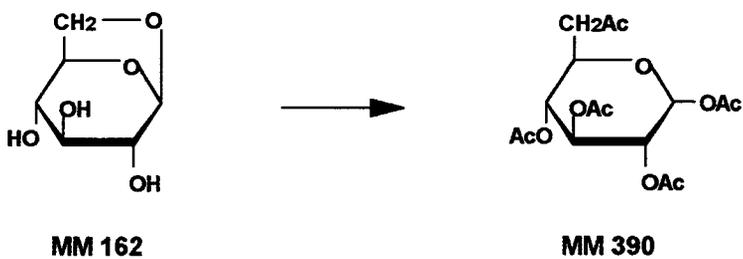
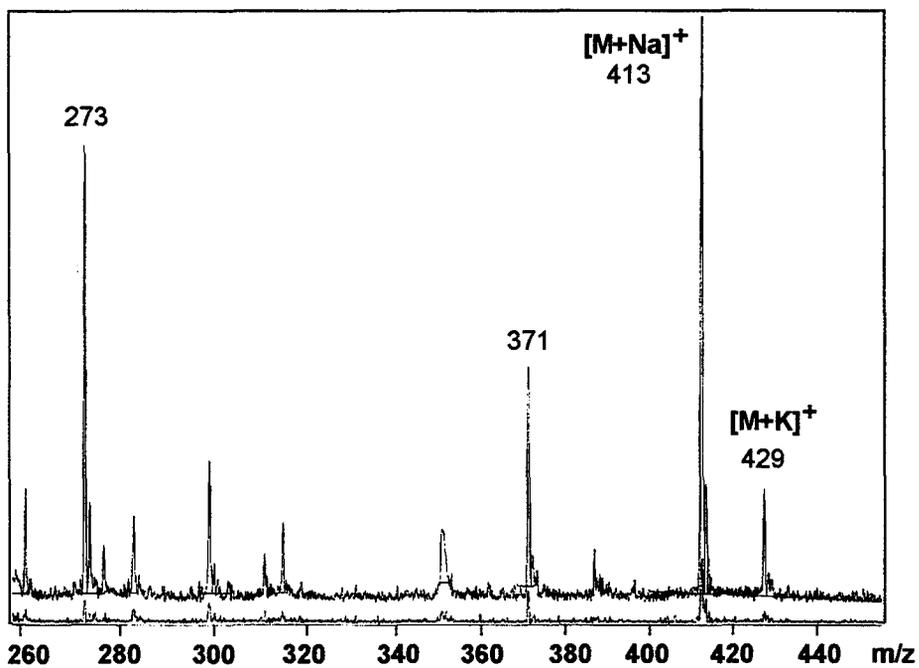
Figure 70: Spectre MALD des homoglucoses-2AB isolés du polydextrose Pfizer A par HPLC sur colonne C18

de structure. Les oligosaccharides marqués au 2AB du polydextrose Pfizer A ont été isolés et analysés par spectrométrie de masse par MALD (Figure 70). Les espèces moléculaires identifiées sont  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$  respectivement à  $m/z$  323 et 339 pour le DP1-2AB. L'incrément de masse entre deux degrés de polymérisation est de 162. Par ailleurs, nous n'avons pas observé sur les spectres de dérivés de type glucose-HMF, sorbitol-HMF, glucose-acide lévulinique, sorbitol-acide lévulinique marqués au 2AB ce qui confirme leur faible représentativité dans les polymères.

### ***Régénération de la fonction aldéhydique des (glc)<sub>n</sub>- anhydroglucose***

Lors de la chromatographie sur colonne C18, la fraction collectée au volume mort contient les oligosaccharides terminés par un anhydroglucose, par un alditol et les sels en grande quantité. Afin de poursuivre la stratégie, le fractionnement des composés (glc)<sub>n</sub>-anhydroglucose nécessite une étape de régénération d'une fonction réductrice. La méthode envisagée consiste en une peracétylation afin d'éliminer les sels par extractions chloroformiques, une acétolyse ménagée et une désacétylation. Afin de valider le protocole, l'étude de la régénération de la fonction aldéhydique des anhydroglucoses a nécessité un témoin oligosaccharidique anhydroglucose. Cependant aucun oligosaccharide non substitué sur les hydroxyles et possédant un anhydroglucose en position terminale réductrice n'est commercialisé. Seul le monomère de 1,6 anhydroglucose est disponible et il a donc servi aux essais préliminaires. L'analyse par MALD du 1,6 anhydroglucose acétylé par une solution d'anhydride acétique et d'acide trifluoroacétique (10/1, v/v) a montré que les conditions expérimentales permettent non seulement de peracétyler le sucre mais aussi de couper la liaison acétalique interne (Figure 71). La réaction libère un glucose peracétylé représenté par l'espèce moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  412. La peracétylation dans ces conditions s'apparente ainsi à une réaction d'acétolyse quantitative car l'espèce à  $m/z$  311 correspondant à  $[M+Na]^+$  de l'anhydroglucose peracétylé est absent du spectre. La seconde étape a été de s'assurer que les conditions opératoires n'acétolysaient pas les liaisons osidiques des oligosaccharides. La réaction a donc été effectuée sur un trisaccharide, le panose, dont l'un des glucoses est lié en  $\alpha(1-6)$ , liaison la plus labile lors de l'acétolyse. L'analyse par MALD a démontré par la présence du trisaccharide peracétylé,  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  989, et par aucune trace de disaccharide peracétylé,  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  701, la stabilité des liaisons osidiques dans les conditions utilisées (Figure 72). Lorsque la réaction de peracétylation a été appliquée au polydextrose Pfizer A, la présence de sels a limité le rendement de peracétylation. La stratégie devait donc comporter

Intensité relative



anhydride acétique / acide trifluoroacétique  
(10/1 - v / v)

Figure 71: Peracétylation en milieu acide du 1,6 anhydroglucose

Intensité relative

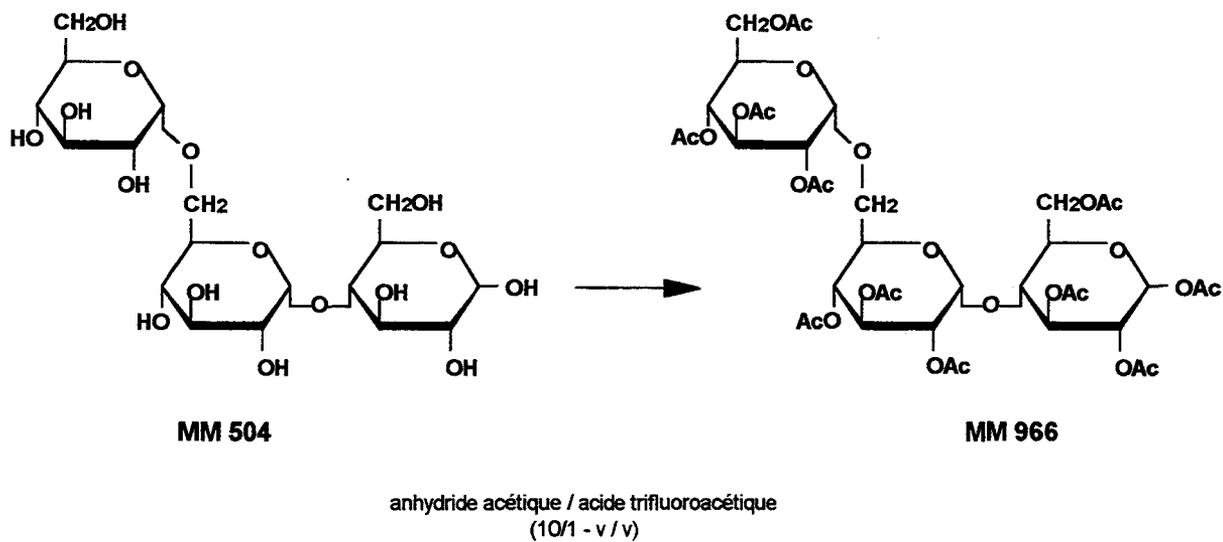
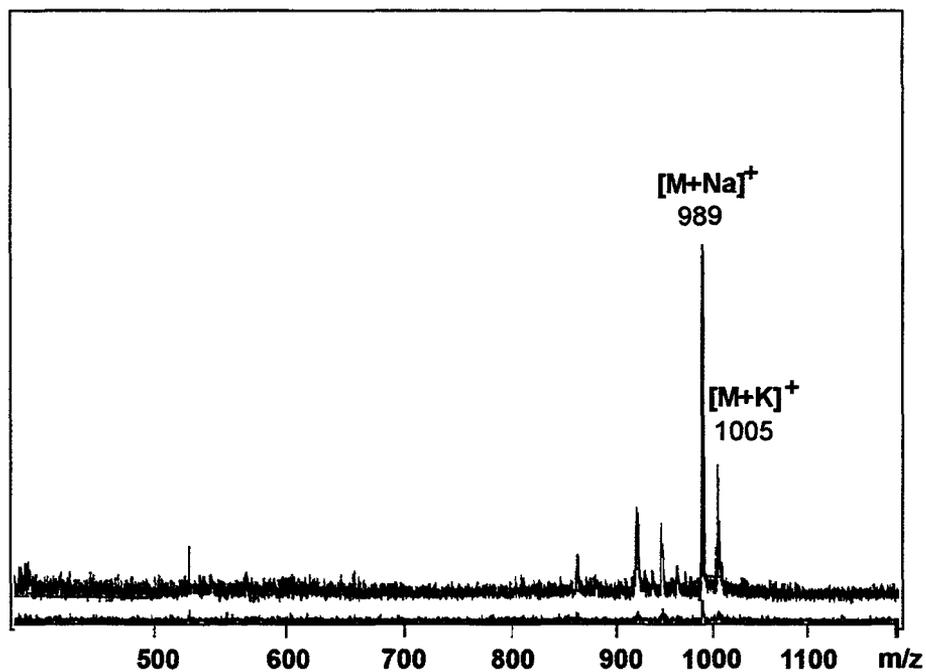


Figure 72: Peracétylation en milieu acide du panose

une étape supplémentaire de dessalage. Les procédés courants de dessalage par chromatographie ne sont pas applicables aux polymères polydispersés. Par exemple, une étape de chromatographie de filtration sur gel P2 ne permettrait pas de séparer la totalité de la répartition glucidique des sels. L'évaporation sous vide ou des codistillations répétées au rotavapor ont été testées mais ne parviennent pas à éliminer la quantité trop importante de borates. La présence importante de sels a été la première limite de notre stratégie lors de la régénération de la fonction aldéhydique des anhydroglucoses.

### ***Régénération de la fonction aldéhydique des (glc)<sub>n</sub>-alditols***

La littérature décrit la coupure entre deux carbones vicinaux porteur d'une fonction hydroxyle libre et la régénération de fonctions aldéhydiques par oxydation périodique suivie d'une réduction. Dans le cadre de notre stratégie, nous avons choisi cette méthode afin de régénérer une fonction aldéhydique aux molécules de (glc)<sub>n</sub>-sorbitol. Dans des conditions de concentration, de température, de temps et de pH, le periodate peut couper sélectivement entre deux carbones vicinaux de sucres réduits comme le glucitol, encore appelé sorbitol (Whelan *et al.*, 1959). Les priorités de coupure entre les différents carbones portant les hydroxyles vicinaux ont été déterminées, liaison (3-4) thréo > (2-3) thréo > (4-5) érythro > (5-6) érythro > (1-2) érythro, par Hutson *et al.*, en 1961. Dans le cadre de l'analyse structurale du polydextrose Pfizer A, nous avons mis en évidence dans les composés glucose-sorbitol de DP2 des liaisons en (1-6), suspecté d'autres liaisons que nous n'avons pas pu confirmer par GC/MS et nous avons montré la présence de sorbitol mono, di, tri et même tétrasubstitués lors de l'analyse globale. D'une part, pour les oligosaccharides alditols peu branchés, l'application de l'oxydation périodique ménagée au polydextrose Pfizer A conduirait à un nombre important de produits qui ne ferait qu'amplifier l'hétérogénéité de la fraction destinée à une étude structurale rendue de ce fait encore plus délicate. D'autre part, pour les sorbitols tétrasubstitués, qui pourraient même dans le cas extrême ne pas posséder deux carbones hydroxylés vicinaux, l'oxydation périodique serait alors incapable de régénérer une fonction aldéhydique. Enfin, l'élimination des borates sans modification de la répartition glucidique des polymères n'étant pas résolue, cette étape n'a pu être entreprise car les fractions issues d'une oxydation périodique demandent une étape de dessalage avant d'être analysées ou dérivées par amination réductive.

Pour conclure, le fractionnement chimique des oligosaccharides par famille de composés grâce à la réaction d'amination réductive a pu être réalisé avec succès pour l'isolement des homoglucooses réducteurs du polydextrose Pfizer A et du polyglucose Roquette I. Les fractions homoglucooses 2AB correspondant aux oligosaccharides réducteurs des polymères glucidiques ont été caractérisées en spectrométrie de masse en mode MALD. Il n'a pas été détecté sur les spectres des espèces correspondant aux composés de type glucose-HMF-2AB ou glucose-acide lévulinique-2AB démontrant ainsi la faible proportion de ces produits dans nos polymères glucidiques. La suite de la stratégie impliquant une régénération d'une fonction aldéhydique pour les deux familles anhydroglucose et sorbitol a posé quelques problèmes. La présence importante de borates issus du milieu réactionnel de la réaction d'amination a gêné les protocoles de régénération de fonction aldéhydique comme l'acétolyse ou l'oxydation périodique et aucune méthode n'a permis d'éliminer ces sels en conservant la distribution glucidique des polymères intacte. Pourtant, la réaction de peracétylation en milieu acide destinée à peracétyler des oligosaccharides afin de les dessaler par extraction chloroformique s'est avérée très intéressante car elle acétolyse la fonction acétalique interne des anhydroglucooses sans couper les liaisons osidiques. Les conditions de la réaction d'oxydation périodique des résidus de sorbitol restent encore à améliorer. L'optimisation de ces étapes de régénération des fonctions aldéhydiques est très difficile étant donné le manque de témoins notamment d'oligosaccharides (glc)<sub>n</sub>-anhydroglucose.

### 5. 3. Discussion

L'analyse structurale globale des polymères glucidiques Pfizer A et Roquette I, notamment lors de la détermination des points de branchement et du taux de substitution, confirme la notion d'hétérogénéité obtenues par condensation de monomères de glucose (et de sorbitol) en milieu acide et à chaud. En effet, dans les deux produits, presque toutes les positions de substitution ont été mises en évidence sur des résidus de glucose mono, di, tri et tétra-substitués. Pour le polydextrose Pfizer A, l'ajout de sorbitol influence la polycondensation des résidus de glucose. En effet, ce résidu contribue à l'élaboration du polymère de deux façons différentes. Il peut soit être monosubstitué et se positionner en position terminale réductrice soit être di, tri et même tétra-substitué pour jouer le rôle de point de ramification dans les oligosaccharides. La présence de glucoses perméthylés en quantité légèrement supérieure

dans le polydextrose Pfizer A suggère une substitution par liaisons acétaliques des résidus de sorbitol par le glucose. D'autre part, le sorbitol limite le taux de substitution des résidus de glucose. La réticulation des polymères est due dans le cas du polydextrose Pfizer A par le sorbitol et dans le cas du polyglucose Roquette par des résidus de glucose. Pour expliquer la limitation de la ramification des polymères par le sorbitol, nous avons tenté de construire les molécules constituant le DP moyen. Il a été démontré au cours des études précédentes que ces polymères possèdent un DP moyen de 5. Or dans le cas d'un DP5 uniquement constitué de glucose, cas des polyglucoses Roquette, il est possible de construire des molécules ayant un glucose tétrasubstitué, ou d'autres avec un glucose trisubstitué et un glucose disubstitué. Par contre, quand on veut ajouter dans la molécule un résidu de sorbitol, lorsqu'il est en position terminale, la molécule ne peut posséder au maximum un glucose trisubstitué, et lorsqu'il est en position interne, quelque soit le type de liaison, un glucose disubstitué. L'exemple du DP moyen permet de visualiser la possibilité de diminution du taux de substitution des résidus de glucose lors de l'incorporation de sorbitol dans les polymères. Les substitutions du glucose les plus représentées sont en 6 et en 4. De nombreux pics présents sur les chromatogrammes, en très faible quantité, n'ont pas été attribués de façon précise mais certains d'entre-eux correspondent à des cycles furaniques et ceci a été observé pour les deux produits. L'ensemble de ces résultats démontrent une conformation tridimensionnelle des polymères de polydextrose Pfizer A et de polyglucose Roquette I.

La mise en évidence de produits comme le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (HMF) et l'acide lévulinique montre que les conditions de préparation des polymères sont responsables de la déshydratation du glucose en milieu acide et à chaud. Le mécanisme de formation du HMF et de l'acide lévulinique ainsi que du très grand nombre de leurs dérivés sont très discutés. Néanmoins de nombreux auteurs s'accordent pour attribuer au HMF le rôle de précurseur à la formation des produits colorés. Le phénomène de la coloration est dû à une délocalisation électronique au niveau de liaisons insaturées. L'apparition de la coloration au cours de la fabrication du polydextrose a une importance considérable sur le plan industriel car l'enjeu est d'obtenir un produit incolore afin de pouvoir être incorporé directement aux préparations alimentaires. Or, une solution de glucose chauffée passe progressivement de la coloration incolore, à jaune suivie par la formation de précipités bruns et finalement de produits résineux noirs. Ces derniers non solubles ont une composition variable en fonction des conditions opératoires mais sont toujours très riches en carbone et en hydrogène: ils sont appelés les humines. Ces produits de polymérisation du HMF et des intermédiaires de

dégradation ont été aussi décrits lors de la dextrinification des matières amylacées au moment de l'étape de saccharification. Les composés, glucose-HMF, glucose-acide lévulinique, sorbitol-HMF et sorbitol-acide lévulinique, que nous avons mis en évidence, sont en très faible quantité, sont donc susceptibles d'intervenir dans le développement de la coloration des polydextroses et ultérieurement dans la formation des humines.

Le fractionnement des polymères par précipitation fractionnée à l'éthanol a montré, par MALD, dans la fraction 70%, la présence de degré de polymérisation au moins égal à 31. Ces constituants de hautes masses moléculaires n'avaient pas été mis en évidence dans les produits non fractionnés. Ce résultat confirme la présence du phénomène de suppression des hautes masses moléculaires d'un polymère dispersé lors des analyses par MALD.

Le fractionnement sur colonne Diol par HPLC a permis l'obtention de fractions enrichies en un degré dépolymérisation donné et nous a aidé à mieux comprendre l'hétérogénéité des polydextroses notamment lors de l'étude structurale des DP2 du polydextrose Pfizer A. Concernant la fraction D<sub>1</sub>, treize produits ont été identifiés comme étant des DP2 glucose-anhydroglucose. Le nombre de composés permet de suspecter la présence toutes les structures possibles. Sachant que d'une part le monomère de 1,6 anhydroglucose est présent dans les deux polymères sous formes pyranique et furanique et que d'autre part, lors du processus de dextrinification de l'amidon, la réaction de déshydratation produit des oligosaccharides terminés par un résidu de 1,6 anhydroglucose, la détermination structurale de ces produits a permis de montrer que les DP2 glucose-anhydroglucose sont des disaccharides constitués d'un résidu de 1,6 anhydroglucose substitué en 2, 3 ou 4. Les produits formés sont énergiquement les plus stables car la fonction alcool primaire en 6 est la plus sensible à la déshydratation et le pont anhydro en 1,6 est alors favorisé par rapport à des anhydroglucoses en 1,3 ou 1,2. Ces DP2 ont pour origine la déshydratation du glucose en milieu acide et à chaud et une réaction de réversion.

Concernant des DP2 glucose-glucose, les résultats sont ceux attendus car il a été démontré il y a de nombreuses années que la condensation en milieu acide de glucose conduit à des molécules telles que le gentiobiose, maltose et isomaltose et même de tréhalose (Thompson *et al.*, 1954). Les liaisons en (1-6), (1-4), (1,3) et (1-2) sont classées dans le sens décroissant de leur probabilité car la proportion relative des disaccharides contenant ces liaisons est représentative de la réactivité des fonctions chimiques. Les liaisons en (1-6) sont majoritaires.

Les cycles furanique n'ont pas été étudiés en détail pourtant, étant donné l'équilibre pyrane/furane naturel des sucres et la présence des monomères de glucose et

d'anhydroglucose sous formes pyranique et furanique, leur présence est certaine. Les cycles furaniques moins favorisés sont donc naturellement moins représentés dans le produit final.

Pour le polydextrose Pfizer A, l'analyse des disaccharides glucose-sorbitol a montré une dominance des glucose-sorbitol en  $\alpha(1-6)$  et  $\beta(1-6)$ . Cette liaison est chimiquement la plus stable. D'autres liaisons ne sont pas exclues car nous avons fait mention de sorbitol di, tri et tétra-substitués. Le sorbitol est donc effectivement incorporé au polydextrose lors du processus de condensation. Il peut même subir une déshydratation car nous avons montré la présence d'anhydrosorbitol.

Nous avons montré l'absence de liaison éther dans les disaccharides glucose-glucose, glucose-sorbitol et glucose-anhydrosorbitol. Les liaisons sont de type osidique.

A ce stade de l'étude, la détermination de la structure a permis de mieux comprendre le nom de substituts de sucre basse-calories attribué à ces polymères de type polydextrose. La dégradation des polymères par les enzymes digestives est limitée la présence d'un ensemble de liaisons atypiques c'est-à-dire autres que la liaison  $\alpha(1-4)$  dégradée par l' $\alpha$ -amylase salivaire, l' $\alpha$ -glucoamylase et l' $\alpha$ -amylase pancréatique dans la lumière intestinale et la liaison  $\alpha(1-6)$  dégradée par l'isomaltase. D'autre part, la présence de monomères de glucose di, tri et tétra-substitués, implique une dégradabilité faible par les enzymes digestives qui ne reconnaissent pas leur substrat glucidique. Dans le cas du polydextrose Pfizer A, la présence de sorbitol lié diminue encore la possibilité d'attaque des enzymes digestives sur les oligosaccharides car ce résidu forme des points de ramification impliquant un environnement stérique très différent de celui d'un oligosaccharide linéaire.

#### 5. 4. Conclusion générale

L'hétérogénéité structurale observée lors des analyses RMN et par spectrométrie de masse, MALD et ES a été confirmée lors de la détermination structurale réalisée dans ce chapitre. L'analyse structurale des polymères glucidiques a été réalisée en plusieurs étapes dont deux majeures, une analyse structurale globale visant à faire le bilan des liaisons osidiques et des substitutions et une analyse structurale plus fine ayant pour objectif de déterminer les liaisons, la nature des liaisons et l'anométrie, ceci après fractionnement des produits. Trois types de fractionnement ont été effectués, la précipitation éthanolique, une

étape chromatographique sur colonne Diol, un fractionnement grâce à l'amination réductive sur une colonne C18, permettant ainsi différentes approches.

La détermination des points de branchement par formation des méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés et leur analyse par GC/MS nous a permis de confirmer une structure très hétérogène des polydextroses Pfizer A et Roquette I. Il semble que toutes les liaisons soient représentées avec une dominance des liaisons en (1-6). Des cycles pyraniques et furaniques ont été observés. Les premiers sont évidemment les plus représentés. Les résidus de glucose sont mono, di, tri ou tétrasubstitués impliquant un taux de branchement important des polymères qui a été confirmé par réduction (D), méthylation, éthanolyse, deutérométhylation et analyse des dérivés formés par GC/MS en mode d'ionisation chimique. La présence du sorbitol dans le polydextrose Pfizer A montre que ce résidu peut être soit à la place du résidu de glucose terminal réducteur soit intégré à l'oligosaccharide en étant mono ou plurisubstitué. Dans ce cas les résidus de glucoses substitués semblent être en proportion légèrement plus faible que dans le cas d'un polyglucose. Cependant les deux polymères ne montrent pas de différence très significative et leurs taux de substitutions apparaissent très voisins.

La description du monomère de 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (HMF) dans le polydextrose natif nous a amené à rechercher les produits de dégradation du glucose à chaud en milieu acide. Nous avons mis en évidence par GC/MS et ES des composés de condensation du glucose et du sorbitol sur le HMF et l'acide lévulinique. Différents types de liaison entre ces résidus ont été observés en fonction des groupes réactionnels en présence. Ce type de produits peut être responsable du développement de la coloration notamment dans le cas de leur polymérisation. Ce phénomène est à limiter dans le processus de fabrication du polydextrose, qui doit nécessairement être incolore pour être utilisé dans les préparations alimentaires.

Le fractionnement par précipitation éthanolique a montré rapidement ses limites en ne permettant pas d'isoler chacun des degrés de polymérisation comme cela en avait été l'objectif. Cependant l'analyse MALD de la fraction 70% éthanol a montré des DP supérieurs à 30 qui n'avaient pas été observés dans le produit non fractionné. Le faible pourcentage d'oligosaccharide de haut poids moléculaire décrit par le Food Chemical Codex par chromatographie de filtration sur gel a été confirmé par spectrométrie de masse. Il apparaît que les oligosaccharides ont la même composition que les plus bas DP c'est-à-dire un résidu de sorbitol ou d'anhydroglucose par molécule.

Un fractionnement chimique des polymères a été tenté par amination réductive des oligosaccharides réducteurs et purification des oligosaccharides-2AB sur une colonne de phase inverse. Notre objectif de séparer ainsi les différentes familles d'oligosaccharides a été atteint en ce qui concerne les homoglucooses. Le spectre MALD montre les oligosaccharides marqués au 2-AB séparé par un degré de polymérisation soit 162 Da. De nombreuses difficultés ont été rencontrées lorsque nous avons voulu traiter les oligosaccharides non réducteurs à motif anhydroglucose ou sorbitol. La formation des fonctions aldéhydiques des résidus sorbitol et anhydroglucose s'est avéré être très difficile à cause de la quantité importante de sels due à la réaction d'amination réductive et à l'impossibilité de séparer les oligosaccharides de ces sels de façon quantitative, sans contrarier la distribution glucidique des produits.

Le fractionnement sur colonne Diol par HPLC a permis l'obtention de fractions fortement enrichies en un degré de polymérisation. L'analyse structurale fine des fractions D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> du polydextrose Pfizer A nous a aidé à élucider la structure des DP2 des trois familles, (glucose)<sub>n</sub>, (glucose)<sub>n-1</sub>-sorbitol et (glucose)<sub>n-1</sub>-anhydroglucose. Les disaccharides à anhydroglucose apparaissent comme étant des molécules comprenant un anhydroglucose en 1,6. La fonction alcool primaire du glucose étant la plus réactive, la déshydratation en 6 est la plus probable et l'acétal en 1,6 est le plus stable. Les liaisons osidiques avec le résidu de glucose pour former le disaccharide ne peuvent alors être qu'en (1-4), (1-3) et (1-2). Il n'a pas été mis en évidence de liaison éther.

La proportion des liaisons est déterminée par la réactivité des fonctions chimiques mises en jeu dans les conditions de fabrication des produits. Les liaisons les plus probables sont en (1-6), (1-4), (1-3) puis en dernier lieu en (1-2) car il s'agit du sens décroissant de la réactivité des fonctions alcool.

La comparaison des temps de rétention de témoins glucose-glucose et glucose-sorbitol sous forme de dérivés triméthylsilylés ou méthylés par chromatographie en phase gazeuse, a rendu possible l'attribution des disaccharides glucose-glucose liés de façon osidique en (1-2), (1-3), (1-4), (1-6) avec les deux formes anomériques  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que les disaccharides glucose-sorbitol liés en  $\alpha(1-6)$  et  $\beta(1-6)$ .

Les polydextrose sont d'après leur structure précédemment déterminée des polymères glucidiques hétérogènes difficilement dégradables par les enzymes digestives. Les  $\alpha$ -amylases salivaire et pancréatique, l' $\alpha$ -glucoamylase et l'isomaltase n'ont certainement que peu de substrats disponibles étant donné la configuration tridimensionnelle des polymères et leur taux

de ramification élevé. La partie de sorbitol liée dans le polymère de polydextrose Pfizer A peut encore réduire l'accessibilité aux enzymes de par sa participation en tant que motif en position terminale réductrice ou comme points de réticulation où viennent se brancher par liaison de type acétalique 2, 3 ou 4 résidus de glucose.

---

## **Conclusion Générale et Perspectives**

---

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Une littérature relativement ancienne décrit le polydextrose comme un polymère glucidique obtenu par polycondensation en milieu acide et à chaud, de monomères de sucre comme le glucose et de sorbitol, en présence d'un catalyseur acide. La définition de ce type de produit utilisé comme substituts de sucres basse-calorie dans des préparations alimentaires est somme toute très restreinte et limitée du point de vue informations structurales. Notre étude a été réalisée parallèlement sur le polyglucose Roquette, obtenu par polycondensation de glucose en présence d'un acide minéral ( $H_2SO_4$ ) et sur le polydextrose Pfizer A, obtenu par polycondensation de glucose et de sorbitol en présence d'acide citrique. Le travail qui nous a été confié a consisté, d'une part à l'étude de la distribution glucidique des polymères, c'est-à-dire la détermination des masses moléculaires moyennes en nombre ( $\overline{Mn}$ ), en poids ( $\overline{Mp}$ ), le degré de polymérisation moyen ( $\overline{DP}$ ) et l'indice de polydispersité ( $I$ ), et d'autre part en l'étude structurale des oligosaccharides constituant ces polymères afin de déterminer la nature des monomères, le (ou les) type(s) de liaison, les positions de liaisons et l'anomérisation. Ces deux domaines d'investigations qui se sont révélés être bien souvent complémentaires nous ont aidé à caractériser les deux polymères glucidiques.

### Degré de polymérisation et Degré de polymérisation moyen:

La chromatographie de filtration sur gel nous a permis de déterminer le  $\overline{Mn}$ , le  $\overline{Mp}$  et l'indice de polydispersité  $I$  qui renseigne sur la largeur de la distribution glucidique. Pour le polydextrose Pfizer A, les paramètres ainsi déterminés sont les suivants: le  $\overline{Mn}$  à 710, le  $\overline{Mp}$  à 1550, et  $I$  égal à 2,2 et pour le polyglucose Roquette I: le  $\overline{Mn}$  à 830, le  $\overline{Mp}$  à 1660, et  $I$  égal à 2,0. Ces polymères se présentent en distributions glucidiques faiblement dispersées allant de masses moléculaires inférieures au monomère de glucose (180) et jusqu'à environ 11.000 Da pour le polydextrose Pfizer A et 16.000 Da pour le polyglucose Roquette ce qui correspond respectivement à des oligosaccharides de DP68 et 99. Le  $\overline{DP}$  a été estimé à partir de la masse moléculaire moyenne en nombre à 4,3 pour le polydextrose Pfizer A et à 5,0 pour le polyglucose Roquette. Les analyses préliminaires concordent pour attribuer un  $\overline{DP}$  entre 4 et 5 pour les deux polymères exprimé en masses relatives c'est-à-dire en équivalent maltooligosaccharides ou pullulans utilisés comme standards de calibration tant pour la chromatographie de filtration sur gel que pour la cryométrie.

Les résultats des analyses des polymères glucidiques de type maltodextrine et polydextrose par ES et MALD ont été comparés ensuite à ceux obtenus par chromatographie de filtration sur gel. Comme dans le cas de polymères synthétiques polydispersés décrits dans la littérature, nous avons obtenus des valeurs de paramètres montrant une sous-estimation importante des hautes masses moléculaires. A titre d'exemple, le  $\overline{M_p}$  du polyglucose Roquette est estimé à 1170 par MALD et à 986 par ES par rapport à une valeur de 1660 obtenue par chromatographie de filtration sur gel. Cette différence est encore accrue lorsque l'indice de polydispersité augmente comme dans le cas des maltodextrines faiblement hydrolysée où par exemple le  $\overline{M_p}$  du Glucidex 12 est estimé à 16.200 par chromatographie de filtration sur gel et à environ 1.200 par spectrométrie de masse. Quelque soit le polymère étudié, les valeurs de distribution glucidiques obtenues par les deux techniques de spectrométrie de masse sont en accord.

Des explications proposées pour expliquer cette différence sont une discrimination des masses moléculaires par suppression des hautes masses lors des analyses par MALD et un rendement d'ionisation dépendant de la masse moléculaire des oligosaccharides lors des analyses par ES. En l'état actuel de nos connaissances, il serait maintenant intéressant de connaître le comportement des composés de hautes masses moléculaires en mélange dans un échantillon dispersé lors des processus de désorption-ionisation par ES et MALD. Pour se faire, il est nécessaire de préparer des témoins oligosaccharidiques de masses moléculaires réparties sur toute la gamme de masse des polymères que nous voulons étudier. L'analyse d'un mélange équimolaire de ce type permettrait de connaître le comportement de ces hauts DP lors de la co-cristallisation matrice-échantillon et leur désorption lors des analyses par MALD, ainsi que la formation des espèces multichargées et leurs répartitions dans des analyses par ES.

D'autre part, nous avons mis en évidence par MALD lors du fractionnement éthanolique des polymères des oligosaccharides de degré de polymérisation au moins égal à 30, c'est-à-dire des masses d'environ 4300 Da. Ces oligosaccharides n'avaient pas été observés sur les spectres du produit non fractionné. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse d'une discrimination des masses par MALD expliquant la sous-estimation des valeurs de paramètres de répartition glucidique par la désorption privilégiée des bas DP au détriment des plus lourds lorsque ceux-ci sont en mélange dans un échantillon dispersé. Comme le préconisent certains auteurs, il serait intéressant maintenant de séparer les polymères glucidiques en fractions oligosaccharidiques d'indice de polydispersité proche de 1 afin de recalibrer par spectrométrie

de masse les valeurs de chromatographie de filtration sur gel. Une seconde possibilité serait un fractionnement on-line HPLC couplé directement à la spectrométrie de masse par électrospray. Cette technique devrait nous permettre d'observer un ordre d'élution dépendant de la compacité de la structure et pour une masse moléculaire donnée la spectrométrie de masse en tandem pourrait renseigner sur les branchements.

#### Description des monomères:

La spectrométrie de masse possède l'avantage indéniable sur toutes les autres techniques de mener en parallèle d'une analyse semi-quantitative, une étude structurale des oligosaccharides constituant les produits permettant de déterminer les types de monomères constituant les polymères. A ce propos, nous avons montré par FAB, MALD et ES que les polymères se répartissent en familles de produits présentes à chaque degré de polymérisation. Le polyglucose Roquette comprend deux familles, celle des homoglucooses et celle des oligosaccharides à anhydroglucose. Les oligosaccharides à anhydroglucose en position terminale représentent environ 20% des oligosaccharides homoglucooses. Sur la base d'un degré de polymérisation moyen proche de 5, les résidus d'anhydroglucooses liés représentent alors environ 4% des résidus. Le polydextrose Pfizer A, quant-à-lui, se compose de quatre familles, celle des homoglucooses, celle des oligosaccharides à anhydroglucose, des oligosaccharides à sorbitol et à anhydrosorbitol. Chaque degré de polymérisation présent dans la répartition glucidique des polymères est constitué d'oligosaccharide ne contenant qu'un seul résidu anhydroglucose, sorbitol ou anhydrosorbitol. Les oligosaccharides à anhydrosorbitol ont été détectés, en très faible proportion. Ils représentent environ 6% des oligosaccharides à alditol et moins de 4% des oligosaccharides totaux. Les oligosaccharides à anhydroglucose représentent environ 42% des homoglucooses seuls et environ 14% de la somme des oligosaccharides alditols et des homoglucooses. La part des oligosaccharides à anhydroglucose est donc plus faible dans le polydextrose Pfizer A que dans le polyglucose Roquette. Ces proportions relatives peuvent s'expliquer par la formation rapide des résidus d'anhydroglucooses et par la condensation des résidus de glucose sur le sorbitol étant donné que le sorbitol ne peut pas réagir avec les anhydroglucooses.

La présence de motifs anhydroglucose et anhydrosorbitol suggère une déshydratation des monomères en présence due aux conditions de préparation des polymères combinant acidité et chaleur, et l'incorporation de ces motifs dans les oligosaccharides des polymères. Les monomères de 1,6 anhydroglucooses sous forme pyranique et furanique ont été identifiés et dosés ainsi que le 5-hydroxyméthyl-2-furfural (HMF). Ces molécules sont toutes issues de la

dégradation en milieu acide et à chaud du glucose qui sont regroupées sous le terme de réactions de brunissement non enzymatiques. Les composés glucose-HMF et glucose-acide lévulinique ont été identifiés dans le polyglucose Roquette et les produits précédents ainsi que le sorbitol-HMF et le sorbitol-acide lévulinique ont été observés dans le polydextrose Pfizer A. Des oligosaccharides de DP supérieurs ont aussi été détectés. Ces composés, représentés en faibles quantités dans les polymères, sont à la fois des précurseurs de produits colorés et des humines et responsable d'un bruit de fond non négligeable sur les spectres de masse.

Des composés glucose-acide citrique ont aussi été détectés en très faible quantité dans le polydextrose Pfizer A.

#### Type de liaisons:

Sur la base d'un sorbitol par oligosaccharide alditol et d'un rapport lors de la mise en oeuvre de la réaction de condensation de 8,9 glucoses pour 1 sorbitol, nous avons calculé que le modèle statistique basé sur un  $\overline{DP}$  proche de 6 représenté par environ 66% d'oligosaccharide alditols et 33% d'oligosaccharide réducteurs est assez représentatif du produit comme le montrent les spectres obtenus par MALD et ES du polydextrose Pfizer A natif et méthylé qui expriment clairement la dominance des oligosaccharides à sorbitol. Aussi, du point de vue des liaisons, la constitution des oligosaccharides à sorbitol peut être de trois natures différentes. En effet, le sorbitol peut être en position terminale réductrice pour former un oligosaccharide non réducteur ou en position interne dans l'oligosaccharide. Dans le cas d'un sorbitol interne, il peut être substitué par des glucoses en liaisons acétaliques, l'oligosaccharide alditol formé possède alors deux glucoses en position terminale non réductrice ou alors substitué par liaison acétalique et éther et dans ce cas l'oligosaccharide alditol est réducteur. Deux analyses permettent de réfuter la possibilité de liaison éther. D'une part, le polydextrose Pfizer A est méthanolysable alors que les liaisons éthers sont stables vis-à-vis de cette réaction et d'autre part, lors du marquage par amination réductive du polymère, la fraction homogluco-2AB isolée par chromatographie en phase inverse et analysée par MALD ne montre pas la présence d'oligosaccharides alditol marqués au 2AB. Lors de l'analyse par GC/MS du produit méthylé, méthanolysé et acétylé, nous avons remarqué la présence de résidus de sorbitol mono, di, tri et tétra substitués en très faible quantité. Ce résultat confirme que les résidus de sorbitol sont majoritairement intégrés au polymère en position terminale réductrice et que peu de sorbitol sont liés à plusieurs glucoses. Il serait intéressant de déterminer les points de substitution des résidus de sorbitol interne et terminal, par exemple par des analyses LC/ES-MS/MS de dérivés partiellement méthylés et acétylés.

Par ailleurs, la vitesse de réaction de condensation du sorbitol doit être plus importante que celle du glucose. Il serait possible pour se rendre compte de l'évolution de la réaction de polymérisation d'analyser les échantillons de polydextroses prélevés à différents stades de la réaction.

La nature des liaisons entre les résidus formant les DP2 a été confirmée lors de l'analyse par GC/MS ( $\text{ND}_3$ ) des fractions  $D_1$  et  $D_2$  issues du fractionnement sur colonne Diol réduites et méthylées. Ces fractions n'ont pas révélé la présence de liaison éther. Les composés glucose-anhydroglucose, glucose-glucose et glucose-sorbitol sont liés par des liaisons osidiques.

Par ailleurs, nous avons montré la possibilité de liaisons osidiques et/ou acétalique entre le glucose et le HMF, de liaisons ester entre le glucose et l'acide lévulinique, de liaisons éther et acétalique entre le sorbitol et le HMF et de liaisons cétalique et ester entre le sorbitol et l'acide lévulinique dans ces composés très faiblement représentés.

#### Points de substitution et anomérie:

Les points de substitution des résidus de glucose déterminés par l'analyse des dérivés partiellement méthylés et acétylés démontrent, dans les deux produits, la présence de glucose mono, di, tri et tétrasubstitués avec toutes les possibilités de position. Les liaisons en 6 et 4 sont majoritaires. Cependant, les analyses ne démontrent pas de réelle différence de substitution entre les deux polymères.

L'analyse par GC/MS en mode CI et EI de la fraction  $D_1$  triméthylsilylée a permis de mettre en évidence environ treize composés glucose-anhydroglucose différents. Les structures sont donc les suivantes:  $\alpha$  et  $\beta$  glucose (1-2) 1,6 anhydroglucose,  $\alpha$  et  $\beta$  glucose (1-3) 1,6 anhydroglucose,  $\alpha$  et  $\beta$  glucose (1-4) 1,6 anhydroglucose. La structure en (1-4) est majoritaire. Les structures furaniques ne sont que très faiblement représentées.

Des renseignements sur les isoméries de position des liens glycosidiques ont été obtenus lors de l'attribution des composés glucose-glucose et glucose-sorbitol de la fraction  $D_2$  effectuée par GC/MS en mode CI et EI. Les disaccharides réducteurs suivants ont été détectés: glucose  $\alpha$ (1-2) glucose (kajibiose), glucose  $\beta$ (1-2) glucose (sophorose), glucose  $\alpha$ (1-3) glucose (nigérose), glucose  $\beta$ (1-3) glucose (laminaribiose), glucose  $\alpha$ (1-4) glucose (maltose), glucose  $\beta$ (1-4) glucose (cellobiose), glucose  $\alpha$ (1-6) glucose (isomaltose), glucose  $\beta$ (1-6) glucose (cellobiose), glucose ( $\alpha$ 1-1) glucose (tréhalose). Les disaccharides alditols attribués sont le glucose  $\alpha$ (1-6) sorbitol et le glucose  $\beta$ (1-6) sorbitol.

Les composés majoritaires sont le glucose  $\alpha(1-6)$  glucose, le glucose  $\beta(1-4)$  glucose ainsi que le glucose  $\alpha(1-6)$  sorbitol. La RMN a été la seule technique à montrer de façon indéniable la présence dominante des liaisons en  $\alpha(1-6)$  dans les deux polymères.

D'autres composés en plus faibles quantités ont été détectés en GC/MS-EI comme étant des disaccharides à cycle furanique.

L'ensemble des renseignements structuraux apportés par notre travail ne fait que confirmer l'extrême hétérogénéité de structure des polymères glucidiques obtenus par polycondensation de monomères en milieu acide et à chaud. Elle fait apparaître que le mécanisme de polycondensation n'est pas un phénomène aléatoire comme cela a pu être quelque fois décrit. Nous remarquons que la condensation a lieu en fonction (i) des réactivités des différents groupement en présence: la réactivité des hydroxyles pour former une liaison qui est décroissante de la position en 6, 4, 3 puis 2; pour le sorbitol, les groupements alcools primaires sont plus réactifs que les secondaires; la déshydratation du glucose est préférentielle sur l'alcool primaire, (ii) de l'isomérisation des monomères, la forme pyranique est favorisée par rapport à la forme furanique et l'anomère  $\alpha$  est favorisé (iii) de l'accessibilité des résidus pour se condenser dans l'environnement stérique du polymère amorcé.

La caractérisation structurale que nous avons effectuée permet d'appréhender la relation structure/fonction de ces polymères utilisés comme substituts de sucres basse-calorie. Des liaisons atypiques, c'est-à-dire différentes de celles en  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-6)$  dégradables par les enzymes digestives, des glucoses di, tri et tétrasubstitués, des cycles pyraniques et furaniques, divers composés de dégradation des monomères en milieu acide et à chaud ainsi que la conformation tridimensionnelle des polymères glucidiques doivent être responsable de la difficulté de reconnaissance enzyme/substrat ce qui explique la faible digestibilité et le bas pouvoir calorique du polydextrose. Dans le cas du polydextrose Pfizer A, le sorbitol intégré donne au polymère une hétérogénéité supplémentaire insensible aux enzymes. La structure tridimensionnelle des polymères explique aussi pourquoi ces produits sont utilisés comme agent de formulation et agent texturant où ils jouent le rôle de ballast et donnent du volume aux préparations alimentaires pauvres en calories.

---

## **Appendice Technique**

---

## MATERIELS

### 1. Oligosaccharides

Maltooligosaccharides DP2 à 7 (Sigma)

Disaccharides isomaltose, gentiobiose, laminaribiose, tréhalose, cellobiose, nigérose, kojibiose (Sigma) et sophorose (Serva), leucrose (Fluka)

1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucose et panose (Fluka)

$\beta$ -cyclodextrine (Roquette)

### 2. Polymères glucidiques

Maltodextrines Glucidex<sup>®</sup> 12, 19 et 33 (Roquette)

Polydextroses

Polydextrose Pfizer A - Brevet 3.766.165 - (Société Pfizer)

Les conditions de préparation du polydextrose brut encore appelé polydextrose Pfizer A sont un mélange glucose/sorbitol/acide citrique dans les proportions 89/10/1 soumis à une cuisson sous vide, à haute température (140-160°C), pendant 8 à 24 heures.

Polyglucoses Roquette I et Roquette II (Société Roquette)

Le polyglucose Roquette I est obtenu sous vide et température de 140 à 150°C, d'un mélange de glucose anhydre fondu en présence d'acide minéral, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 mg/kg). Le polyglucose Roquette II est le résultat du polyglucose Roquette I traité à la glucose oxydase (Roquette, Brevet FR93-13943).

## METHODES

### CHAPITRE 1. Caractérisation de polymères glucidiques

#### 1. Etudes préliminaires

##### 1. 1. Chromatographie de filtration sur gel

La chromatographie de filtration sur gel est réalisée sur une HPLC (Waters) équipée d'une précolonne KB 800P et de trois colonnes de 8 mm x 30 cm, de type KB 805, 803 et 802 (Shodex) montées en série et maintenues à 35°C. Le tampon d'éluion est une solution de nitrate de sodium 0,1 M, préalablement filtrée sur filtre Millipore 0,25 µm et dégazée. Le débit est de 0,5 ml/min. La détection est réalisée par réfractométrie (réfractomètre Waters, modèle R410). La calibration du système HPLC est obtenue grâce à une série de témoins qui comprend les pullulans de masse 853.000, 380.000, 186.000, 100.000, 48.000, 23.700, 12.200, 5.800 (Waters), les maltooligosaccharides de DP7 (1153), DP6 (991), DP5 (829), DP4 (667), DP3 (504), DP2 (342), le glucose (180), la glycérine (92) et l'éthylène glycol (62 Da). Les standards ainsi que les échantillons sont préparés à la concentration de 5 mg/ml d'éluant. 250 µg sont injectés sur les colonnes.

##### 1. 2. Cryométrie

Les mesures d'osmolalités sont effectuées grâce à un cryoscope automatique (Fiske) selon les modalités décrites par Fitton (1979). La calibration est réalisée avec les maltooligosaccharides de DP2 à 7 et des maltodextrines de différents degrés d'hydrolyse (DE).

##### 1. 3. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN des différents échantillons ont été réalisés au sein de la société Roquette sur un spectromètre AC 250 (Bruker) opérant à 250 MHz et utilisant la Transformée de Fourier. La durée des impulsions est de 8 µs pour (90°) et le délai entre chaque impulsion est fixé à 2 s. Les analyses sont effectuées à une température de 25°C dans des tubes de 5 mm de diamètre. La concentration des échantillons dissous dans le D<sub>2</sub>O (99,96% atomes de Deutérium) est comprise entre 5 et 10% (p/v). Les déplacements

chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm par rapport au 2,2,3,3 tétradeutéro-4,4-triméthyl-4-silapentanoate de sodium (TSP) utilisé comme standard interne.

## 2. Caractérisation par spectrométrie de masse

### 2. 1. Analyses par FAB

Les analyses en FAB des maltooligosaccharides sont réalisées sur un spectromètre de masse à quatre secteurs Kratos Concept IIIH (Kratos, Manchester, U.K) équipé d'un système de données DS90 (DG : DG 30). L'énergie d'accélération des atomes neutres de xénon est de 8 keV. Le mélange équimolaire de maltooligosaccharides natifs de DP2 à 7 (20 nmoles par DP) est dissous dans 1,5  $\mu$ l de matrice glycérol/eau/triéthylamine (3/2/1 - v/v) et analysé en mode négatif. Ce même mélange, préalablement perméthylé, est analysé en mode positif dans la matrice thioglycérol/acétate de sodium 0,5 M. Les spectres de masse sont obtenus par balayage à 10 secondes par décade dans une gamme de masse m/z de 400 à 1200.

Pour l'analyse des polymères glucidiques, l'appareil est utilisé selon des conditions de LSIM grâce à un jet d'ions césium de 30 keV. Le polydextrose Pfizer A natif en poudre est dissous à saturation dans 1,5  $\mu$ l de la matrice glycérol/eau/triéthylamine (3/2/1 - v/v). Le dérivé perméthylé (150  $\mu$ g) est analysé dans 1,5  $\mu$ l de matrice thioglycérol/acétate de sodium 0,5 M. Les spectres de masse sont obtenus par balayage à 10 secondes par décade dans la gamme de masse m/z de 400 à 3200.

### 2. 2. Analyses par ES

Le spectromètre de masse SSQ 7000 (Finnigan MAT) est un appareil de type quadripôle (limite de masse à 2500 Da). La source électrospray est connectée à une pompe à seringue (Harvard apparatus 22) pour une introduction des échantillons par infusion. La calibration en masse est réalisée en utilisant une solution équimolaire à 10 nanomoles/ml de maltooligosaccharides commerciaux de DP2 à 7 dissous dans une solution 0,2 mM en acétate de sodium dans le mélange méthanol/eau (50/50 - v/v). La concentration finale des échantillons soumis à l'analyse est de l'ordre de 10 picomoles/ $\mu$ l pour les oligosaccharides et de 500 picomoles/ $\mu$ l pour les maltodextrines et les polydextroses et infusés à un débit de 3  $\mu$ l/min. Les analyses sont réalisées en mode positif avec un voltage de 105 Volts au niveau du skimmer et une différence de potentiel appliquée au niveau du capillaire de 5 kV. La tension à l'octapole est de 0,1 Volt pour les échantillons analysés dans la gamme de masse m/z de 200

à 1500. Cette zone de masse est balayée par 10 scans de 10 secondes soit une période de 100 secondes pour produire chaque spectre. La tension à l'octapole est portée à 1,6 Volts pour la gamme de masse  $m/z$  de 200 à 2500, balayée par 10 scans de 18 secondes soit 180 secondes par spectre. La température du capillaire est de 200°C. Le voltage de l'électromultiplicateur est de 2000 Volts et la résolution unitaire de l'analyseur est fixée à 0,7 à 50% de hauteur.

### 2. 3. Analyses par MALD

Les analyses sont réalisées sur un appareil de spectrométrie de masse VISION 2000 (Finnigan Mat) à temps de vol utilisant un faisceau laser à azote de longueur d'onde 337 nm et de durée de pulse fixée à 3 ns. Les spectres sont mesurés en mode positif avec une énergie d'accélération de 6 keV. Les oligosaccharides natifs en solution dans l'eau et les dérivés méthylés en solution dans le méthanol sont mélangés sur la cible à 1  $\mu$ l de matrice. La matrice utilisée est l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque à une concentration de 12 mg/ml dans une solution méthanol/eau (70/30 v/v) à laquelle est ajouté du P316 (1,4 naphthalène dipropionate de sodium), à la concentration de 2 mg/ml, comme agent de cationisation. Les dépôts sont cristallisés sous courant d'air tiède.

L'irradiance c'est-à-dire la puissance laser par unité de surface délivrée à chaque impulsion sur le dépôt matrice/échantillon est fixée à 50% de la puissance totale du laser soit 4,5 MW/cm<sup>2</sup>.

## CHAPITRE 2 : Analyse structurale des polymères glucidiques

### 1. Etudes préliminaires

#### 1. 1. Composition chimique et normes du Food Chemical Codex

##### Normes FCC

Les tests A, B, C et D d'identification du polydextrose, les essais concernant le dosage des espèces glucose, sorbitol, acide citrique, 1,6 anhydro- $\beta$ -D-glucopyranose et 5-HMF libres ainsi que le dosage des matières sèches et minérales sont décrits dans la 4<sup>ème</sup> édition du Food Chemical Codex (Edition de mars 1996).

## Composition chimique

Une hydrolyse acide du polydextrose est nécessaire afin de déterminer les quantités totales de glucose et de sorbitol. Pour se faire, 200  $\mu$ l d'une solution de polydextrose à 100 mg/ml sont traités par ajout de 1,8 ml d'une solution de HCl 2M et maintenus pendant 1 heure à 100°C. Après neutralisation du milieu à pH 7 par de la soude 4M, le volume est complété à 10 ml avec de l'eau.

La détermination des taux de glucose total et résiduel est réalisée par voie enzymatique grâce à l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase suivie d'une détection spectrophotométrique à 340 nm du NADPH/H<sup>+</sup> (kit Boehringer Mannheim). Les quantités de sorbitol total et résiduel sont également déterminées par voie enzymatique par l'action de la sorbitol déshydrogénase suivie d'une lecture à 340 nm de l'absorbance du NADH/H<sup>+</sup> formé (kit Boehringer Mannheim).

La mesure de l'absorption à 340 nm après action combinée de la citrate lyase, de la malate-déshydrogénase et de la lactate déshydrogénase permet de doser l'acide citrique libre et total dans les échantillons (kit Boehringer Mannheim). Dans le cas du dosage de l'acide citrique total, une saponification est réalisée sur le polymère. Pour cela, 500  $\mu$ l d'une solution de polydextrose à 10 p 100 (p/v) sont traités par 2,5 ml d'une solution de NaOH 0,5M, pendant 30 min, à température ambiante. Le mélange est ensuite neutralisé par une solution de HCl 1M et complété avec de l'eau à un volume de 5 ml. Le dosage est réalisé comme mentionné ci-dessus.

### 1. 2. Infrarouge

Les analyses ont été effectuées grâce à un spectromètre d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (Perkin Elmer). Les spectres sont obtenus par la méthode de pastillage au KBr.

## 2. Analyse structurale par spectrométrie de masse

### 2. 1. Composition en monosaccharides

#### Méthanolyse

Un mélange composé de 100  $\mu$ g de polydextrose lyophilisé contenant 10  $\mu$ g de mésoinositol (standard interne) est méthanolysé en ajoutant 200  $\mu$ l d'une solution de méthanol chlorhydrique (MeOH/HCl) 0,5M, pendant 24 heures, à 80°C, dans un tube en verre étanche de type Sovirel. Le milieu réactionnel est évaporé sous courant d'azote et repris

par 200 µl de méthanol distillé. Trois lavages de la phase méthanolique sont réalisés à l'heptane successivement (200 µl x 3) afin d'éliminer les éventuels acides gras. La phase méthanolique est ensuite séchée sous courant d'azote:

#### Triméthylsilylation

La dérivation des monosaccharides en leurs dérivés triméthylsilylés est obtenue par addition de 50 µl de pyridine et de 50 µl de bis-silyltri fluoroacétamide (BSTFA, Pierce) sur le résidu sec précédemment obtenu. La réaction de silylation est complète après 2 heures de réaction à température ambiante et à l'obscurité.

#### Chromatographie en phase gazeuse (GC)

Les monosaccharides triméthylsilylés sont analysés sur un chromatographe Girdel équipé d'une colonne de méthylsilicone OV 101 (25 x 0,33 mm) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La pression du gaz vecteur, l'hélium est de 0,5 bar. L'injecteur à baguette de verre est de type Ross. Le programme de température est: 120 à 240°C à raison de 2°C par minute. La température de l'injecteur est 240°C et celle du détecteur 250°C.

## 2. 2. Mise en évidence du HMF et de l'acide lévulinique

### Synthèse des produits de condensation

Les milieux réactionnels sont composés de sucres (glucose ou sorbitol), de produits de dégradation du glucose (HMF ou d'acide lévulinique) et d'un acide (acide citrique ou d'acide sulfurique). Le rapport molaire est de 1 mole de sucre pour 0,5 mole de produit de dégradation du sucre. Les milieux sont amenés à 60 p 100 de matière sèche par ajout d'une solution d'acide à 2 p 1000. La dissolution des composés est favorisée en plaçant les milieux à 60° pendant 2 heures. Ils sont alors laissés à température ambiante pendant 2 jours. Une aliquote de 50 µl de chacun des 8 milieux est prélevée, évaporée sous courant d'azote avant d'être analysée.

### Préparation des dérivés oximés

L'oximation des milieux de synthèse précédents et des produits industriels de type polydextrose est réalisée sur 1 mg d'échantillon auquel on ajoute 5 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH, HCl) et 200 µl de pyridine. La réaction se déroule pendant 40 minutes à 100°C. Les dérivés oximés sont ensuite triméthylsilylés.

### Analyse par GC/MS en mode CI (NH<sub>3</sub>) et EI

Les milieux de synthèse contenant les produits de condensation ainsi que les échantillons de polydextrose Pfizer A et de polyglucose Roquette I sont dérivés par triméthylsilylation comme décrit dans le paragraphe précédent. La séparation des molécules est réalisée par

chromatographie en phase gazeuse en appliquant sur une colonne DB5 de 25  $\mu\text{m}$  (30 x 0,32 mm) un gradient linéaire de température de 50 à 300°C (7°C/min). L'identification des molécules est réalisée par spectrométrie de masse (SSQ 7000, Finnigan). Deux modes d'ionisation, chimique en présence d'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) ou par impact électronique, sont utilisés.

#### Analyse par ES

Les solutions de polydextroses à 10 mg/ml dans une solution méthanol/eau (50/50 - v/v) et amenés à une concentration finale en acétate de sodium 0,5M sont amenés dans la source à un débit de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Les conditions d'analyses sont décrites dans le paragraphe 2.2.

### 2. 3. Inventaire des points de branchement

#### Méthylation

Le protocole de méthylation utilisé est celui décrit par Ciucanu et Kerek. Brièvement, les échantillons (200  $\mu\text{g}/\text{polymère}$  - 50  $\mu\text{g}/\text{maltooligosaccharide}$ ) lyophilisés sont dissous dans 250  $\mu\text{l}$  de diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO), auxquels sont ajoutés quelques mg de soude en pastille finement pulvérisée. Le tube est placé au bain à ultrasons pendant 15 minutes. 200  $\mu\text{l}$  d'iodure de méthyle ( $\text{ICH}_3$ ) sont ajoutés puis le milieu réactionnel est incubé de nouveau 30 à 45 minutes au bain à ultrasons. La réaction est arrêtée par ajout de 1 ml d'eau et l'iode formée au cours de la réaction est détruite par du thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) en poudre. Les dérivés perméthylés sont extraits par 2 x 200  $\mu\text{l}$  de chloroforme et la phase chloroformique obtenue est lavée par 10 fois 5 ml d'eau. La phase chloroformique contenant les dérivés perméthylés est déshydratée par passage sur une microcolonne de sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Les polymères glucidiques sont soumis à deux cycles de méthylation avant d'être méthanolysés.

#### Méthanolyse

Cette réaction est réalisée par addition de 300  $\mu\text{l}$  d'une solution de MeOH/HCl 0,5N, à 80°C pendant 24 heures. Les réactifs sont éliminés par évaporation sous courant d'azote.

#### Peracétylation

Les méthyl-glycosides sont acétylés en présence d'une solution de 50  $\mu\text{l}$  de pyridine et 200  $\mu\text{l}$  d'anhydride acétique. La réaction se déroule à l'obscurité, pendant 15 heures, à température ambiante. L'excès de réactifs est éliminé par séchage sous courant d'azote. Les méthyl-glycosides partiellement méthylés et acétylés sont repris dans du méthanol afin d'être analysés par GC/MS.

## Analyse par GC/MS

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sont effectuées sur un appareil de type quadrupole (NERMAG R10 10, Ruel Malmaison) couplé à un chromatographe en phase gazeuse Delsi DI 700. Le programme de température appliqué sur la colonne capillaire de type OV 101 (25 x 0,3 mm de diamètre interne) est un gradient de 120 à 240°C à raison de 2°C/min. L'ionisation par impact électronique utilise une énergie d'ionisation de 70 eV et l'ionisation chimique se fait à l'aide de l'ammoniac comme gaz réactant.

### 2. 4. Estimation du degré de ramification

#### Réduction

200 µg d'oligosaccharides sont dissous dans 1 ml d'eau et le pH est amené à 10 par ajout d'ammoniaque 0,1M. 500 µg d'agent réducteur,  $\text{KBH}_4$  ou  $\text{NaBD}_4$ , sont ajoutés à la solution. La réaction de réduction se déroule pendant 15 heures, à température ambiante et à l'obscurité. L'excès de réducteur est détruit par addition de résine échangeuse de cations de type Dowex 50 x 8 (sous forme  $\text{H}^+$ ) jusqu'à disparition de tout dégagement gazeux (pH 5, 6). Les sels de borates sont éliminés par codistillations sous vide en présence d'un mélange méthanol/acide acétique (10/1, v/v).

#### Méthylation (Voir paragraphe précédent)

#### Ethanolyse

Cette étape est une variante de la méthanolyse dans laquelle la solution de MeOH/HCl 0,5M est remplacée par une solution d'éthanol/HCl 0,5M.

#### Deutérométhylation

Dans le cas particulier d'une perdeutérométhylation, le protocole utilisé est identique à celui de la méthylation mis à part le remplacement de l'iodure de méthyle par 50 µl d'iodure de deutérométhyle ( $\text{ICD}_3$ ). Les dérivés sont analysés par GC/MS en mode d'ionisation chimique ( $\text{ND}_3$ ).

#### Analyse par GC/MS en mode d'ionisation chimique

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique sont effectuées sur un appareil de type quadrupôle (NERMAG R10 10, Ruel Malmaison) couplé à un chromatographe en phase gazeuse Delsi DI 700. Le programme de température appliqué sur la colonne capillaire de type OV 101 (25 x 0,3 mm de diamètre interne) est un gradient de 120 à 240°C à raison de 2°C/min. L'ionisation chimique est effectuée à l'aide de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) comme gaz réactant.

## CHAPITRE 3 : Fractionnements des polymères glucidiques

### 1. Précipitation éthanolique

Le polymère glucidique, Pfizer A (2 fois 5 g) est partiellement purifié par précipitation fractionnée à l'éthanol. Les précipitations ont lieu à des concentrations en éthanol absolu de 70, 75, 80, 85, 90 et 95%. Le volume initial de la solution à 70 % est de 200 ml et le rapport p/v pour chaque étape est constant. Les précipitations sont réalisées à 4°C. Une ampoule à décanter permet de verser la solution éthanolique goutte à goutte dans un flacon continuellement agité. Les précipités obtenus sont conservés une nuit à 4°C avant d'être centrifugés (1h, 13.500 g, 4°C). Chaque précipité est ensuite récupéré et soumis à un séchage sous courant d'azote afin d'éliminer les traces d'éthanol puis lyophilisé et pesé. Le surnageant est concentré au rotavapor, lyophilisé puis pesé. Le surnageant peut alors subir le même protocole en étant traité par une solution plus riche de 5% en éthanol.

### 2. Amination réductive

#### Amination réductive

200 µg d'oligosaccharides réducteurs sont tout d'abord traités pendant 1h à 80°C en présence de 77 µl d'une solution de 2-AB (2-aminobenzamide) (1,5 mg - Fluka) dans l'eau, le méthanol et l'acide acétique glacial (50/22/5, v/v). Après refroidissement, une solution de cyanoborohydrure de sodium (5 mg - Aldrich) dans le mélange eau, méthanol et acide acétique glacial (150/50/20, v/v) contenant 2 mg de 2-AB est ajouté et le milieu est maintenu de nouveau pendant 1 heure à 80°C.

#### Extractions au chloroforme

Le milieu réactionnel est concentré sous courant d'azote puis le pH est amené entre 9 et 10 par adjonction d'une solution d'ammoniaque 0,1M. Un volume de chloroforme est ajouté au volume de la phase aqueuse afin de réaliser la première extraction. La phase aqueuse est ensuite lavée 4 fois par 1 volume de chloroforme avant d'être analysée par HPLC en phase inverse.

#### Chromatographie liquide à haute performance

Les oligosaccharides dérivés au 2-AB sont analysés sur une colonne C18 analytique Zorbax (250 x 0,4 mm, 300 Å, 5µm) à un débit de 0,7 ml/min ou préparés en plus grande quantité sur une colonne C18 préparative Vydac (250 x 9,4 mm, 300 Å, 5 µm) à un débit de 2 ml/min, thermostatées à 50°C. Le gradient de solvant est de 0 à 10 minutes à 100% eau, ATFA 0,05% et 10,1 à 60 min gradient de 0 à 50% acétonitrile, ATFA 0,05%. La détection

est assurée par un UV réglé à 254 nm. Pour chaque analyse, la fraction contenant les oligosaccharides dérivés est collectée, évaporée à l'évaporateur rotatif et lyophilisée avant d'être analysée.

#### Chromatographie ascendante sur papier (Oxford Glycosystem)

Les phases chloroformiques obtenues lors de la dérivation des oligosaccharides sont séchées sous courant d'azote puis reprises dans 100 µl d'eau afin d'être déposées sur une feuille de papier Watman n°3. Le solvant de la phase mobile est une solution constituée du mélange n-butanol/acide acétique/eau (4/1/1, v/v). Après migration, la zone des oligosaccharides marqués au 2-AB est repérée par fluorescence sous une lampe UV, découpée et immergée dans 2 ml d'eau. Après quelques minutes, la phase aqueuse contenant les oligosaccharides marqués est récupérée et lyophilisée.

#### Peracétylation acide

Une solution comprenant un mélange anhydride acétique/acide trifluoroacétique (10/1, v/v) est préparé extemporanément. 100 µg d'oligosaccharides lyophilisés puis séchés par deux fois 300 µl de dichlorométhane sous courant d'azote, sont traités par 200 µl de la solution précédente préalablement refroidie. Le milieu réactionnel est maintenu 35 heures à 40°C. L'excès de réactif est éliminé par évaporation sous courant d'azote et les oligosaccharides peracétylés sont dissous dans le méthanol absolu pour leur analyse.

### 3. Chromatographie liquide à haute performance sur colonne Diol

L'appareil Dionex utilisé pour réaliser de la chromatographie liquide haute performance en phase normale sur une colonne Lichrosorb Diol (25 cm x 4 mm, 10 µm, Merck) équipé de la détection électrochimique (Système PAD, *pulsed amperometric detection*). Le débit est de 1 ml/min. Le fractionnement est réalisé à température ambiante. Dans un but préparatif, les fractions obtenues sont le résultat de 350 injections de 20 µl d'une solution à 150 µg/ml. Les solvants utilisés sont constitués d'acétonitrile et d'eau dans des rapports 73/27 pour le solvant A et 60/40 pour le solvant B. Le programme d'élution est résumé dans le Tableau suivant:

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	100	0
20	100	0
23	0	100
33	0	100
35	100	0

Un collecteur automatique réalise des fractions de 250  $\mu$ l et accumule une trentaine de fractionnements. Les fractions obtenues correspondant aux différents pics du chromatogramme sont regroupées et l'acétonitrile est éliminé au rotavapor. Les fractions sont ensuite lyophilisées.

Les fractions obtenues par fractionnements éthanoliques, par amination réductive ou par HPLC sur colonne Diol sont analysées par cryométrie, chromatographie de filtration sur gel, RMN et spectrométrie de masse (MALD et/ou ES) suivant les protocoles décrits dans les paragraphes précédents.

Seules les analyses des fractions Diol par GC/MS sont effectuées dans des conditions qui diffèrent. Elles sont détaillées ci-dessous.

#### Analyse des DP2 des fractions Diol

Le spectromètre de masse NERMAG R10-10 H (Quad Service, Poissy) est alors équipé d'une colonne HT5 (25 m, 0,32 mm, 0,1  $\mu$ m épaisseur de film). L'injecteur de type Ross à aiguille de verre est stabilisé à une température de 300°C ainsi que le détecteur. Pour l'analyse des oligosaccharides triméthylsilylés, le gradient de température est de 200 à 280°C à raison de 2°C par minute. La pression du gaz vecteur, l'hélium, est de 0,4 Bar. La calibration dans les hautes masses est effectuée grâce à la triazine ( $M^+$  m/z 1185).

L'analyse des oligosaccharides méthylés est réalisée sur le même appareil équipé de la même colonne. Les conditions de température sont différentes. Le gradient de température est de 180 à 210°C à raison de 1°C par minute puis jusqu'à 280°C à 10°C par minute.

En mode d'ionisation chimique, les gaz ionisants sont l'ammoniac ( $NH_3$ ) ou l'ammoniac deutéré ( $ND_3$ ) à une pression dans la source de 1 Torr. En mode d'impact électronique, l'énergie des électrons est classiquement de 70 eV.

---

## Références Bibliographiques

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Allingham R. P.**, 1982, Polydextrose - A new food ingredient : Technical Aspects. Chemistry of Foods and Beverages: Recent Developments 293-303
- Anet, E. F. L. J.**, 1964, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 19, 203
- Angel A. S.**, F. Lindh and B. Nilson, 1987, *Carbohydr. Res.*, 168, 17-31
- Angel A. S.** and B. Nilson, 1990, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 19, 721-730
- Angyal S. J.** et K. Dawes, 1968, *Aust. J. Chem.* 21, 2747-2760
- Antal, M. J. Jr.**, W. S. L. Mok and G. N. Richards, 1990, *Carbohydr. Research*, 199, 91-109
- Anumula K.R.** and P. B. Taylor, 1991, *Eur. J. Biochem.*, 195, 269-280

## B

- Bahr U.**, A. Deppe, M. Karas and F. Hillekamp, 1992, *Anal. Chem.*, 64, 2866-2869
- Barber M.**, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, 1981, *Nature*, 293, 270-275
- Barber M.**, R. S. Bordoli, G. Elliott, A. Tyler, J. Bill and B. N. Green, 1984, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 182-186
- Belu A. M.**, J. M. DeSimone, R. W. Linton, G. W. Lange and R. M. Friedman, 1996, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 7, 11-24
- BeMiller J. N.**, 1967, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 22, 25
- Bigge J. C.**, T. P. Patel, J. A. Bruce, P. N. Goulding, S. M. Charles and R. B. Parekh, 1995, *Anal. Biochem.*, 230, 229-238
- Billmeyer F. W. Jr.**, 1984, Wiley, Textbook, *Polymer Sciences*, 16-19
- Björndal H.**, B. Lindberg and S. Svensson, 1967, *Carbohydr. Res.*, 5, 433-440
- Bonner W. A.**, 1959, *J. Org. Chem.*, 24, 1388
- Bouveng H. O.**, 1961, *Acta Chem. Scand.*, 15, 78 et *Acta Chem. Scand.*, 15, 96
- Bull H. B.** and K. Breese, 1974, *Archives of Biochem. Biophys.*, 161, 665-670
- Bush C. A.**, 1988, *Bull. Magn. Reson.*, 10, (3-4), 73-95
- Bryce D. J.** and C. T. Greenwood, 1963, *Stærke*, 15, 166-170
- Bryce D. J.** and C. T. Greenwood, 1965, *Stærke*, 17, 275-278

**C**

- Caprioli R. M.**, W. T. Moore and T. Fan, **1987**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 1, 15-18
- Carr S. A.** , V. N. Reinhold, B. N. Green and J. R. Hass, **1985**, *Biomed. Mass Spectrom.*, 12, 288-295
- Carvalho D. S.**, J. W. Prins and C. Schuerch, **1959**, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4054-4058
- Cerny M.** and J. Stanek, **1977**, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 34, 23-177
- Chaplin M. F.**, **1994**, in *Carbohydrate Analysis*, édité by Chaplin M. F. and J. F. Kennedy, 2nd edition.
- Choudhry, G.G.** , **1981**, *Toxicological and Environnemental Chemistry*, 4, 209-260
- Christensen G. M.** and F. Smith, **1957**, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4492-4495
- Ciucanu I.** and F. Kerek, **1984**, *Carbohydr. Res.*, 131, 209-217
- Cottrell J. S.**, M. Koerner and R. Gerhards, **1995**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 9, 1562-1564
- Cramer M.** and E. H. Cox, **1922**, *Helv. Chim. Acta*, 5, 884

**D**

- Danis P. O.** and D. E. Karr, **1993**, *Organic Mass Spectrom.*, 28, 923-925
- Danis P. O.**, D. E. Karr, W. J. Simonsick, Jr. and D. T. Wu, **1995**, *Macromolecules*, 28, 1229-1232
- DeBelder A. N.** and B. Norrman, **1968**, *Carbohydr. Res.*, 8, 1-6
- Defaye**, **1970**, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 25, 181
- De Hoffmann E.**, J. Charette and V. Stroobant, **1994**, *Spectrométrie de masse*, Ed Masson, Paris
- Dell A.**, **1987**, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 45, 20-71
- Dell A.**, **1990**, *Methods in Enzymology*, 193, 647-660
- Dias P.** and A. S. Perlin, **1982**, *Carbohydr. Res.*, 100, 103-116
- Dimler J.**, H. A. Davis and G. E. Hilbert, **1946**, *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1377
- Domon B.**, D. R. Mueller and W. J. Richter, **1990**, *Biomed. Env. Mass Spectrom.*, 19, 390-392
- Domon B.**, **1994**, Cahier Imabio, Spectrométrie de masse des molécules biologiques. II. CNRS, 2, 67-72
- Dubreucq G.**, B. Domon and B. Fournet, **1996**, *Carbohydr. Res.*, 290, 185-187
- Dubois J.**, **1988**, *Analysis*, vol. 16, n°3, LXVI-LXXIII

**E**

**Edmonds C. G. and R. D. Smith, 1990, *Methods in Enzymology*, 193, 412-431**

**Egge H and J. Peter-Katalinic, 1987, *J. Mass Spectrom.Rev.*, 6, 331-393**

**F**

**Feather M. S. and J. F. Harris, 1973, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 28, 161-224**

**Fenn J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, 1990, *Mass Spectrom. Rev.*, 9, 37**

**Fenselau C. and R. J. Cotter, 1987, *Chem. Rev.*, 87, 501-512**

**Fetzer W. R., E. K. Crosby, C. T. Engel and L. C. Kurst, 1953, *Ind. Eng. Chem.*, 45, 1073**

**Figdor S. K. and H. H. Rennhard, 1981, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1181**

**Figdor S. K. and J. R. Bianchine, 1983, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 389**

**Finne J., T. Krusius and H. Rauvala, 1980, *Carbohydr. Res.*, 80, 336-339**

**Fischer E., 1890, *Ber*, 23, 3687**

**Fitton M. G., 1979, *Starch*, 31, 11, 381-384**

**Fournet B., G. Strecker, Y. Leroy and J. Montreuil, 1981, *Anal. Biochem.*, 116, 489-502**

**Freudenberg and E. Braun, 1928, *Ann.*, 460, 288**

**G**

**Garrozzo D., G. Impallomeni, E. Spina, B. N. Green and T. Hutton, 1991, *Carbohydr. Res.*, 221, 253**

**Garrozzo D., G. Impallomeni, E. Spina and L. Sturiale, 1995, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 9, 937-941**

**Geerdes J. D., B. A. Lewis and F. Smith, 1957, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4209-4215**

**Geyer R. and H. Geyer, 1994, *Methods in Enzymology*, 230, 87-108**

**Gidley M. J., 1985, *Carbohydr. Res.*, 139, 85-93**

**Gillece-Castro L. and A. L. Burlingame, 1990a, *Methods in Enzymology*, 193, 689-712**

**Gillece-Castro L. and A. L. Burlingame, 1990b, in *Biological Mass Spectrometry* (Burlingame, A. L. and Mc Closkey, J. A. Eds.) Elsevier, Amsterdam, 411-434**

**Golova O. P., N. M. Merlis and Z. V. Volodina, 1959, *J. Gen. Chem.*, U. R. R. S. 978.**

**Gowariker V. R. et al., 1986, *Polymer Science*, Wiley, 86-95**

**Greenwood C. T., 1967, *Adv. Carbohydr. Chem*, 22, 483-515**

**Guittard J., M. Tessier, J. C. Blais, G. Bolbach, L. Rozes, E. Maréchal and J. C. Tabet, 1996, *J. Mass Spectrom.*, 31, 1409-1421**

**Gunnarsson A., 1987, *Glycoconjugate J.*, 4, 239-245**

**Guthrie R. D., 1972, in *The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*, IA, 421-478**

## H

**Hakomori S. I., 1964, *J. Biochem.*, 55, 205-208**

**Harris, J. F., 1973, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 28, 161**

**Harrisson A. G., 1983, *Chemical Ionisation Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton.**

**Harvey D. J., 1993, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 7, 614-619**

**Harvey D. J. 1996, *J. Chromatography*, 720, 429-446**

**Hase S., T. Ikenaka and Y. Matsushima, 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 257-263**

**Hase S., T. Ikenata and Y Mitsushimam, 1981, *J. Biochem.*, 90, 407-414**

**Hase S., T. Ibuki and T. Ikenaka, 1984a, *J. Biochem.*, 95, 197-203**

**Hase S., 1984b, *Methods in Enzymology*, 230, 225-237**

**Hayati I., A. I. Bailey and T. F. Tadros, 1987, *J. Colloid Interface Sci.*, 117, 205-221**

**Hellerqvist C. G., B. Lindberg, S. Svensson, T. Holme and A. A. Lindberg, 1968, *Carbohydr. Res.*, 8, 43**

**Hellerqvist, C. G., 1990, *Methods in Enzymology*, 193, 554-573**

**Hillenkamp F., M. Karas and B. Stahl, 1990, in A. L. Burlingame and J. A. McCloskey, Eds, *Biological Mass Spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, 49**

**Honda S., E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi and J. Nakamura, 1989, *Anal. Biochem.*, 180, 351-357**

**Houminer Y. and S. Patai, 1969, *J. Polym.Sci.*, Part A-1, 7, 3005-3014**

**Hu G. and B. L. Vallee, 1994, *Anal. Biochem.*, 218, 185-191**

## I

**Irvine J. C. and J. W. H. Oldham, 1925, *J. Chem. Soc.*,127, 2903-2922**

## J

**Jackson P., 1994, *Anal. Biochem.*, 216, 243-252**

**Jones C., 1991, *Adv. Carbohydr. Anal.*, 1, 145-194**

**Jones C. and B. Mullroy, 1993, *Methods Mol. Biol.*, 17, 149-167**

**K**

- Käch F.**, (Société Pfizer), **1992**, dans Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les I.A.A., J. L. Multon, Collection Sciences et Techniques Agro-alimentaires
- Karas M.** and F. Hillenkamp, **1988**, *Anal. Chem.*, 60, 2301-2303
- Karas M.**, **1990**, *Trends in Analytical Chem.*, 9, n°10
- Karrer P.**, **1920**, *Helv. Chim. Acta*, 3, 258
- Kerr R. W.** and F. C. Cleveland, **1953**, *Staerke*, 5, 261
- Kilzer F. J.** et A. Broido, **1965**, *Pyroynamics*, 2, 151-163
- Kobata A.**, K. Yamashita and S. Takasaki, **1987**, *Methods in Enzymology*, 138, 84-94
- Kotchetkov N. K.** and O. S. Chizhov, **1966**, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 21, 39-93
- Kotchetkov N. K.**, V. A. Derevitskaya and N. P. Arbatsky, **1976**, *Eur. J. Biochem.*, 67, 129-136

**L**

- Lafont D.**, P. Boullanger, J. Banoub and G. Descotes, **1989**, *Can. J. Chem.*, 69, 828-835
- Lafont D.**, S. Manaudier, P. Boullanger et G. Descotes, **1990**, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 127, 576-583
- Lane J. H.** and L. Eynon, **1923**, *J. Soc. Chem. Ind.*, 32T.
- Larm O.**, B. Lindberg and S. Svensson, **1971**, *Carbohydr. Res.*, 20, 33
- Latourte L.**, J-C. Blais and J-C. Tabet, **1997**, *Anal. Chem.*, 69, 2742-2750
- Lattimer R. P.**, **1992**, paper presented for the *Mixed Polymers Workshop* at the 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC
- Lattimer R. P.**, **1994**, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 55, 221-232
- Leigh W. R. D.** and Z. S. Krzeminski, **1966**, *J. Chem. Soc.*, 1700
- Lerhle R. S.** and D. Sarson, **1995**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 9, 91-92
- Leverly S. B.**, C. E. Roberts, M. E. K. Salyan and S. Hakomori, **1989**, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 162, 838-845
- Leverly S. B.**, C. E. Roberts, M. E. K. Salyan, B. Bouchon and S. Hakomori, **1990**, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 19, 311-318
- Lindberg B.**, **1972**, *Methods in Enzymology*, 28, 12, 178-195
- Lindberg B.**, J. Lönnngren and S. Svensson, **1975**, In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, (Ed. R. S. Tipson and D. Horton), Academic Press, New York, 31, 185-240
- Lindberg B.** and J. Lönnngren, **1978**, *Methods in Enzymology*, 50, 1, 3-33

**Lundblad A.**, P. K. Masson, N. E. Norden, S. Svensson, P. A. Ockerman and J. Palo, **1986**, *Eur. J. Biochem.*, 67, 209-214

## M

**McEwen C.**, C. Jackson and B. Larson, **1996**, *Polym. Prepr.*, 37, 1, 314

**McIntyre D. D.**, C. Ho and H. J. Vogel, **1990**, *Starch*, 7, 260-267

**Mehnert H.**, W. Bachmann and M. Haslbeck, **1982**, *Akt. Endokr. Stoffw.*, 3, 124-125

**Metzger J. W.**, M. Jung, D. Schmalzing, E. Bayer and V. Schurig, **1991**, *Carbohydr. Res.*, 222, 23-35

**Metzger J. O.** and E. Bruns-Weller, **1992**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 6, 143-146

**Moch K. K.**, M. Davey and J. S. Cottrell, **1991**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177, 644

**Montaudo G.**, M. S. Montaudo, C. Puglisi and F. Samperi, **1994**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 8, 1011-1015

**Montaudo G.**, D. Garrozzo, M. S. Montaudo, C. Puglisi and F. Samperi, **1995a**, *Macromolecules*, 28, 7983-7989

**Montaudo G.**, M. S. Montaudo, C. Puglisi and F. Samperi, **1995b**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 9, 453-460

**Montaudo G.**, M. S. Montaudo, C. Puglisi and F. Samperi, **1995c**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 9, 1158-1163

**Montaudo G.**, E. Scamporrino, D. Vitalini and P. Mineo, **1996**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 10, 1551-1559

**Mora P. T.** and E. Pacsu, US Patent Office n° 2 719 179 délivré le 27 septembre **1955**

**Muehleman H. R.**, **1980**, *Swiss Dent.*, 2, 3, 29-32

**Mulrone B.**, J. C. Traeger and B. A. Stone, **1995**, *J. Mass Spectrom.*, 30, 1277-1283

**Murray P. R.**, **1988**, in *Low calorie products*, G. C. Birch and M. G. Lindlen, Elsevier, 7, 83-100

**Musculus**, **1842**, *Bull. Soc. Chim.*, France, [2], 18, 66

## N

**Naylor S.**, A. F. Findeis, B. W. Gibson and D. H. Williams, **1986**, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 6359-6363

**Naylor S.**, G. Moneti and S. Guyan, **1988**, *Biomed. Environn. Mass Spectrom.*, 17, 393-397

**Nohmi T.** and J. B. Fenn, **1992**, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3241-3246

**P**

- Paz Parente J.**, P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil and B. Fournet, **1985**, *Carbohydr. Res.*, 141, 41-47
- Peat S.**, **1946**, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 2, 37-77
- Peat S.**, W. J. Whelan, T. E. Edwards and P. Owen, **1958**, *J. Chem. Soc.*, 586. K
- Pfeifer R. J.** and C. D. Hendricks, **1968**, *AIAA J.*, 6, 496-502
- Phillips L. R.** and B. A. Fraser, **1981**, *Carbohydr. Res.*, 90, 149-152
- Pictet A.**, **1918**, *Helv. Chim. Acta*, 1, 226-230
- Pictet A.** and J. Sarazin, **1918**, *Compt. Rend.*, 166, 38-39
- Pictet A.** and J. Sarazin, **1920**, *Helv. Chim. Acta*, 1, 87-96
- Pigman**, W. and E. F. L. J. Anet, **1982**, In Pigman W. and D. Horton, *The carbohydrates*, 2<sup>nd</sup> Edn, Academic Press, New York, 165
- Poulter L.** and A. L. Burlingame, **1990**, *Methods in Enzymology*, 193, 661-689
- Poulter L.**, R. Karrer and A. L. Burlingame, **1991**, *Anal. Biochem.*, 195, 1-13
- Pringsheim H.** and K. Schmalz, **1922**, *Ber.*, 55, 3001-3007
- Prokai, L.** and W. J. Simonsick Jr., **1993**, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 7, 853-856

**Q**

- Quintero E.**, K. Ishida, G. Gordon and G. Geesey, **1989**, *J. Microbiol. Methods*, 9, 309-322

**R**

- Raphan, H.**, **1975**, IV and V, Pfizer
- Rennhard H. H.**, brevet français n° 1 538 007 délivré le 22 juillet **1968** (Société Pfizer)
- Rennhard H. H.**, London Patent Office, brevet n° 1 262 842 délivré le 9 février **1972** (Société Pfizer)
- Rennhard H. H.**, US Patent Office brevets n° 3 766 156 délivré le 16 octobre **1973** et n° 3 8769 794 délivré le 8 avril **1975** (Société Pfizer)
- Rigal, L.**, **1981**, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse
- Rinehart K. L.**, **1982**, *Science*, 218, 254-260

**S**

- Schauer R.**, **1978**, *Methods in Enzymology*, 50, part C, 64-89
- Schweer J.**, F. Mayer-Posner, K. Müllen, H. J. Räder and J. Spickermann, **1996**, *Macromolecules*, 29, 4536

- Scrimshaw** N. S. and V. R. Young, 1977, Pfizer.
- Shafizadeh** F. and Y. L. Fu, 1973, *Carbohydr. Res.*, 29, 113-122
- Shaw**, P. E., J. H. Tatum and R. E. Berry, 1967, *Carbohydr. Res.*, 5, 266
- Smith** F. and A. M. Stephen, 1961, *J. Chem. Soc.*, 4892
- Somme** R., 1986, *Carbohydr. Res.*, 152, 237-241
- Stahl** B., M. Steup, M. Karas and F. Hillekamp, 1991, *Anal. Chem.*, 63, 1463-1466

## T

- Takemoto** H., S. Hase and T. Ikenaka, 1985, *Anal. Biochem.*, 145, 245-25
- Tanaka** K., 1991, MS Group, Analytical Engineering Department, JEOL LTD, *Evaluation of FAB-MS Method in Quantitative Analysis*
- Tang** X., P. A. Dreifuss and A. Vertes, 1995, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 9, 1141-1147
- Taylor** R. L. and H. E. Conrad, 1972, *Biochemistry*, 11, 1383-1388
- Thompson** A., M. L. Wolfrom and E. J. Quinn, 1953, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 3003-3004
- Thompson** A., K. Anno, M. L. Wolfrom and M. Inatome, 1954, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1309-1311
- Thompson** A. and M. L. Wolfrom, 1958, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6618-6620
- Tinke** A. P., R. A. M. van der Hoeven, W. M. A. Niessen, J. van der Greef, J. P. Vincken and H. A. Schols, 1993, *J. Chromatography*, 647, 279-287
- Tomasik** P., M. Palasinski and S. Wiejak, 1989, in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 47, 203-278
- Tsai** P., A. Dell and C. E. Ballou, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82, 4119-4123

## U

- Usui** T., M. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama and S. Seto, 1974, *Carbohydr. Res.*, 33, 105-116
- Usui** T., M. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama and S. Seto, 1975, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1071-1076

## V

- van Dam**, H. E., A. P. G. Kieboom and H. van Bekkum, 1986, *Starch*, 38, 3, 95-101
- Varki** A. and S. Diaz, 1984, *Anal. Biochem.*, 137, 236-247
- Vliegthart** J. F. G., L. Dorland and H. Van Halbeek, 1983, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41, 209-374
- Vorm** O., P. Roepstorff and M. Mann, 1994, *Anal. Chem.*, 66, 3281-3287

**W**

**Wang** W. T., N. C. LeDonne, Jr. B. Ackerman and C. C. Sweeley, **1984**, *Anal. Biochem.*, 141, 366-381

**Wolff** I. A., D. J. Olds and G. E. Hilbert, **1952**, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 7, 37-40

**Wolfrom** M. L., E. N. Lassetre and A. N. O'Neil, **1951**, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 595-599

**Wong** S. F., C. K. Meng and J. B. Fenn, **1988**, *J. Phys. Chem.*, 92, 546-550

**Y**

**Yamashita** K., T. Mizuochi and A. Kobata, **1982**, *Methods in Enzymology*, 83, 905-926

**Yamashita** M. and J. B. Fenn, **1984**, *J. Chem. Phys.*, 1988, 44516

**Yamashita** M. and J. B. Fenn, **1988a**, *Phys. Chem.*, 88, 4451

**Yamashita** M. and J. B. Fenn, **1988b**, *Phys. Chem.*, 88, 4671

**York** W. S., A. G. Darvill, M. McNeil, T. T. Stevenson and P. Albersheim, **1985**, *Methods in Enzymology*, 118, 3-40

---

**Annexe**

---

DP <sub>n</sub>	(glc) <sub>n</sub>		(glc) <sub>n-1</sub> - anhydroglc
	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+2Na] <sup>2+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
1	203,05	113,02	185,04
2	365,10	194,04	347,09
3	527,16	275,07	509,14
4	689,21	356,10	671,20
5	851,26	437,12	833,25
6	1013,32	518,15	995,30
7	1175,37	599,17	1157,36
8	1337,42	680,20	1319,41
9	1499,47	761,23	1481,46
10	1661,53	842,25	1643,51
11	1823,58	923,28	1805,57
12	1985,63	1004,31	1967,62
13	2147,69	1085,33	2129,67
14	2309,74	1166,36	2291,72
15	2471,79	1247,39	2453,78
16	2633,84	1328,41	2615,83
17	2795,89	1409,44	2777,88
18	2957,95	1490,47	2939,94
19	3120,00	1571,49	3101,99
20	3282,06	1652,52	3264,04

	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+2Na] <sup>2+</sup>
β-CD	1157,36	590,17

H = 1,007825; C = 12,000000; O = 15,994915; Na = 22,989768

Masse monoisotopique des composés homoglucooses et leur forme anhydro correspondante natifs

DP <sub>n</sub>	(glc) <sub>n-1</sub> - sorbitol		(glc) <sub>n-1</sub> - anhydrosorbitol
	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+2Na] <sup>2+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
1	205,06	114,02	187,05
2	367,12	195,05	349,11
3	529,17	276,08	511,16
4	691,22	357,10	673,21
5	853,28	438,13	835,26
6	1015,33	519,16	997,32
7	1177,38	600,18	1159,37
8	1339,43	681,21	1321,42
9	1501,49	762,24	1483,48
10	1663,54	843,26	1645,53
11	1825,59	924,29	1807,58
12	1987,65	1005,32	1969,63
13	2149,70	1086,34	2131,69
14	2311,75	1167,37	2293,74
15	2473,80	1248,39	2455,79
16	2635,86	1329,42	2617,85
17	2797,91	1410,45	2779,90
18	2959,96	1491,47	2941,95
19	3122,02	1572,50	3104,00
20	3284,07	1653,53	3266,06

Masse monoisotopique des composés alditols et de leur forme anhydro correspondante natifs

DP <sub>n</sub>	(glc) <sub>n</sub>		(glc) <sub>n-1</sub> - anhydroglc
	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+2Na] <sup>2+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
1	273,13	148,06	227,08
2	477,23	250,11	431,19
3	681,34	352,16	635,30
4	885,45	454,22	839,41
5	1089,56	556,27	1043,51
6	1293,66	658,32	1247,62
7	1497,77	760,38	1451,73
8	1701,88	862,43	1655,83
9	1905,98	964,488	1859,94
10	2110,09	1066,54	2064,05
11	2314,20	1168,59	2268,16
12	2518,30	1270,64	2472,26
13	2722,41	1372,70	2676,37
14	2926,523	1474,756	2880,48
15	3130,63	1576,81	3084,58
16	3334,73	1678,86	3288,69
17	3538,84	1780,91	3492,80
18	3742,95	1882,97	3696,90
19	3947,05	1985,02	3901,01
20	4151,16	2087,07	4105,12

	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+2Na] <sup>2+</sup>
β-CD	1451,74	737,36

Masse monoisotopique des composés homoglucooses et de leur forme anhydro correspondante perméthylés

DP <sub>n</sub>	(glc) <sub>n-1</sub> - sorbitol		(glc) <sub>n-1</sub> - anhydrosorbitol
	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+2Na] <sup>2+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
1	289,16	156,07	243,12
2	493,26	258,12	447,22
3	697,37	360,18	651,33
4	901,48	462,23	855,44
5	1105,59	564,29	1059,54
6	1309,69	666,34	1263,65
7	1513,80	768,39	1467,76
8	1717,91	870,45	1671,87
9	1922,01	972,50	1875,97
10	2126,12	1074,55	2080,08
11	2330,23	1176,61	2284,19
12	2534,34	1278,66	2488,29
13	2738,44	1380,71	2692,40
14	2942,55	1482,77	2896,51
15	3146,66	1584,82	3100,62
16	3350,76	1686,87	3304,72
17	3554,87	1788,93	3508,83
18	3758,98	1890,98	3712,94
19	3963,09	1993,04	3917,04
20	4167,19	2095,09	4121,15

Masse monoisotopique des composés alditols et de leur forme anhydro correspondante perméthylés

