

Departamento de Bioquímica
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Madrid (Espagne)

Quelques applications de la chromatographie des glucides sur papier

J. Moreno Calvo et A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 19 de septiembre de 1955)

Introduction

La chromatographie des glucides sur papier a acquis dans ces derniers temps une importance considérable. Ils ont été justement les travaux de PARTRIDGE (24), sur les sucres purs ceux qui ont initié des possibilités nouvelles vers la séparation chromatographique des glucides. Dans les importants travaux de BLOCK et colabs.(3), CRAMER (6), ISHERWOOD (13) et KOWKA-BANY (15) pour ne nommer que quelques-uns on trouve une considérable littérature.

Dans le present travail nous prétendons offrir quelques exemples pratiques sur les applications de la chromatographie des glucides sur papier, depuis la simple séparation de sucres purs jusqu'au domaine de l'Enzymologie en passant par l'extraction de sucres de la Nature et en étudiant certaines réactions hydrolytiques, dans lesquels cas la chromatographie sur papier nous a donné des excellents résultats et donc les possibilités et avenir pour les recherches biochimiques ne sont pas encore définitivement épuisées.

Matériel et méthodes

Les glucides utilisés proviennent de firmes reconnues (Kerfoot, Meck, Schering et Schuchardt). On prépara les solutions

de sucres avec de l'eau distillée à la concentration de 1 % (poids: volume). On fabriqua à part les mélanges et chaque composant à la même concentration.

On analisa les produits suivants : lait de vache sans édulcorer, café pur, vin de Xerès et jus d'orange, de cerise et d'abricot.

PRÉPARATION DE L'EMPOIS D'AMIDON.

On prépara l'empois d'amidon de la façon suivante (18) : On met à bouillir 85 cc. d'eau distillée dans une capsule et lorsqu'elle bout on ajoute 2 grammes d'amidon soluble Merck, que l'on avait pesé au préalable dans un pèse-substances taré. On mélange en remuant l'amidon à froid et dans le même pèse-substances avec quelques cc. d'eau distillée. On verse la suspension qui en résulte sur l'eau distillée bouillante. L'opération de verser de l'amidon en suspension dans de l'eau distillée se répète plusieurs fois jusqu'à ce qu'on ait entraîné et nettoyé complètement la quantité d'amidon exactement pesée. Il ne faut pas oublier que l'on doit calculer les quantités liquides ajoutées afin que le volume final ne dépasse pas les 100-x. L'empois obtenu, on le laisse refroidir, puis on y ajoute de l'eau distillée jusqu'à concurrence de 100 cc. La quantité ajoutée x est de l'ordre de 5 à 1 cc. et l'on obtient un empois d'amidon soluble au 2 % (poids : volume). Le pH es de 5.0.

EXTRACTION DE L'AMILASE.

Dans un mortier très propre, lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée, et sec, l'on place 10 grammes de pomme de terre fraîche coupée en petits morceaux. On pulvérise à l'aide d'une petite quantité de sable lavé et sec. Peu à peu on ajoute une solution amortissante de phosphate de pH=7 ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 + \text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) dont on emploie 16 cc. On attend 20 minutes pour permettre la diffusion et on centrifuge pendant 6 minutes à 5.000 r.p.m. le liquide qui surnage (18 à 20 cc.), puis on décante et on centrifuge de nouveau 20 minutes [Nielsen (21)].

On prépara la solution de phosphate pH = 7 en mélangeant 37 cc. et 69 cc. respectivement de dissolutions récentes de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ et PO_4HNa_2 .

DISSOLVANT.

Le dissolvant était un mélange d'acétate d'éthyle-pyridine-eau (2:1:2). On agita les trois liquides puis on les laissa décan-

ter, en employant comme dissolvant la fraction non aqueuse [JERMYN et ISHERWOOD (14) ; ROMINSKI et SUSCHKOWA (25)].

TECHNIQUE.

La technique consiste à rouler le papier Whatman, après y avoir déposé la quantité à analyser comme on le fait couramment en chromatographie sur papier. Pour soutenir le papier et pour qu'il conserve la forme cylindrique il faut le coudre avec du fil blanc et propre. Un fil de couleur employé accidentellement donna un chromatogramme, sur le bord, de la matière colorante décomposée en diverses couleurs.

On met le dissolvant dans une plaque Pétri et le cylindre de papier sans contact direct avec les parois puis on couvre d'une cloche à microscope, l'ajustant à l'aide de graisse de burette à une plaque de verre suffisamment grande pour que la fermeture soit hermétique.

L'on avait placé auparavant la substance problème sur la face interne du papier, dans le cylindre dont on a parlé plus haut.

Pour rendre inactif le système enzymatique sur le papier, on employa une solution 0.01 M de $(CN)_2Hg$.

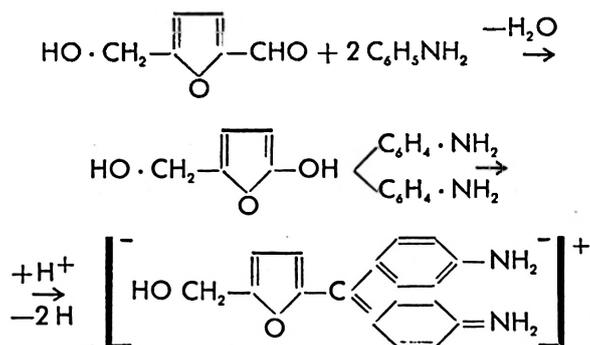
On utilisa le papier Whatman numéro 1 de dimensions 40 × 41 cm., que l'on roula.

En règle générale le dissolvant atteint le bord supérieur (41 cm. de parcours) en 23 heures. Aussi l'on examina les chromatogrammes presque toujours à 21 heures.

RÉACTIF RÉVÉLATEUR.

On employa comme réactif révélateur le nitrate d'argent ammoniacal, la naphtorrésorcine, le réactif de Nylander et celui de Patridge. Ce dernier est le plus commode et présente l'avantage d'augmenter sa sensibilité sous la lumière ultraviolette, ce qui est d'une grande valeur pour l'identification de sucres de taches douteuses dans lesquelles la quantité de substance n'est pas suffisamment grande pour accuser une réaction très évidente. On prépara ce réactif en dissolvant 0.930 grammes d'aniline et 1.6 grammes d'acide phtalique dans 100 cc. d'eau distillée saturée de butanol. Pour révéler, on pulvérisa le chromatogramme sec et l'on chauffe 5 minutes à 105° pendant les premières déterminations. Selon notre propre expérience l'on obtient de meilleurs résultats en chauffant pendant 15-20 minutes.

En prenant comme base les études de VON UDRANSKY (33) et BREDERECK (5) sur la réaction de Molisch, la formation des taches sur le papier doit être dûe au mécanisme suivant :



puisque à cause de la chaleur et des acides les pentoses donnent naissance à α -furfurol-aldéhyde et les hexoses se transforment en ω -oximéthylfurfurol.

Dans le cas des protéines et des mono-peptides on révèle à l'aide de ninhydrine à 0.2 % dissoute dans du butanol-acétique 2N(95+5).

On révèle l'amidon à l'aide d'une dissolution d'iode 0.01 N(1.4 g. de I_2 + 2.0 g. 1K ; dans un litre).

Resultats obtenus

a) Séparation chromatographique des sucres purs.

On obtient la séparation des mélanges des 7 sucres dans la mesure du possible (fig. 1). Une séparation claire se produit entre le lactose (6) et le raffinose (7) d'une part, mais la séparation des cinq premiers en mélange est impossible, et à cause de cela on obtient une tache allongée à l'endroit correspondant à leurs avancées respectives.

On plaça les mélanges de manière à former une série successive de volumes, en vue d'obtenir une base pour juger de la meilleure séparation. On doit tenir compte aussi pour l'activité de cette séparation, de l'effet du front du dissolvant qui apparaît un peu augmenté. Dans l'original les taches de plus grande taille non seulement présentent ce caractère mais elles ont aussi une couleur plus foncée qui va parallèlement.

Dans la partie droite du chromatogramme on mit des échantillons de fructose (4' et 4'') et aussi de lactose (6') de diffé-

rents volumes pour contrôler la bonne marche de l'expérience.

On a calculé les valeurs des Rf obtenus sur l'original et en mesurant directement à la taille naturelle (table I).

Dans cette table on peut observer que les Rf des taches de fructose et de lactose (4', 4'' et 6') concordent. Par conséquent la possibilité d'une perturbation à cause du bord disparaît.

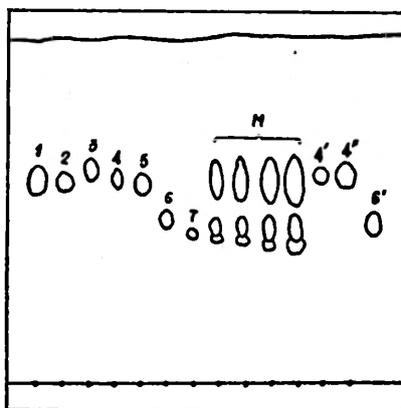


Figure 1

Chromatogramme de quelques sucres et de leurs mélanges.

1 = arabinose; 2 = glucose; 3 = mannose; 4 = fructose; 5 = saccharose; 6 = lactose; 7 = raffinose (16 μ g/tache); M = mélange de 1 + 2... + 7. Volumes employés (de gauche à droite et respectivement) 1, 6 μ l, 3 μ l, 5 μ l et 6, 4 μ l. Le mélange est à la concentration de 1 % (p:v) dans chaque substance.

Comme contrôle 4' = 4 (fructose). 4'' = 30 μ g de fructose et 6' = 16 μ g de lactose.

Papier employé = Whatman n.° 1. Dissolvant acétate d'éthyle-pyridine-eau. Révélateur phthalate d'aniline. Réalisation pendant 21 heures à la température de 18° C.

b) Influence de la concentration mutuelle des sucres sur la valeur de l'Rf du raffinose et du lactose.

Si nous doublons de manière successive le volume de liquide problème, qui contient tous les sucres et chacun (fig. 1), à la concentration de 1 %, et que nous calculons avec ces données les valeurs de l'Rf pour les sucres lactose et raffinose, nous obtenons les chiffres suivants (table II) :

D'où nous déduisons que la meilleure concentration, celle qui conserve la valeur Rf du lactose (table I, égal à 0,47) doit être celle qui correspond aux première et deuxième taches. Tandis que pour le raffinose, dont la valeur est égale à 0,43

TABLE I

Constantes chromatographiques sur papier Whatman n.° 1

Dissolvant: Acétate d'éthyle-pyridine-eau (2 : 1 : 2 :). Déroulement en 21 heures. Température 18° C.

N.° de référence au chromatogramme (l. 1).		Quotient indiqué	Rf	RM *	RG **	RF ***
1	Arabinose	20.4	0,59	-0,1512	1,017	0,995
		34.8				
2	Glucose	20.0	0,58	-0,1337	1,000	0,978
		34.7				
3	Manose	21.3	0,61	-0,1568	1,065	1,042
		34.7				
4	Fructose	20.5	0,59	-0,1302	1,022	1,000
		34.8				
5	Saccharose	20.0	0,57	+0,0708	0'994	0,973
		34.9				
6	Lactose	16.4	0,47	-0,2013	0'815	0,798
		34.9				
7	Rafinose	15.1	0'43	+0,1176	0'751	0'735
		34.9				
4'	Fructose	21.05	0,60	—	—	—
		35.0				
4''	Fructose	21.1	0,60	—	—	—
		35.05				
6'	Lactose	16.2	0,46	—	—	—
		35.0				

$$* RM = \log \left(\frac{1}{Rf} - 1. \right)$$

** RG = Rf/Rf glucose.

*** RF = Rf/Rf fructose.

dans la table I ce doit être celle qui correspond à la première tache.

c) Estimation quantitative du sucre déposé dans les taches.

Comme nous connaissons le volume de la quantité employée et comme nous savons parfaitement la concentration de la dissolution employée, il est toujours facile d'obtenir une échelle de taches à l'aide de laquelle on peut estimer dans tous les cas, avec un 10 % d'erreur la concentration d'un problème de sucres dans des circonstances analogues à celles du chromatogramme type,

TABLE II

Taches de gauche à droite en M (fig. 1)	Rf Lactose	Rf Rafinose
Première	0,456	0,427
Seconde	0,477	0,419
Troisième	0,477	0,407
Quatrième	0,438	0,407

Sur la ligne d'origine du premier chromatogramme (de la série M) que l'on a pris comme unité, l'on mit exactement 16 μ g de lactose et 16 μ g de raffinose, plus 16 μ g de chacun des autres sucres, obtenant, comme on le voit clairement, une séparation nette de lactose et de raffinose (16 μ g) à côté de 96 μ g des autres sucres et sans que se manifeste aucune perturbation.

Dans la série des taches «M» de la figure I, on a mesuré la longueur (en cm.) des taches, obtenant les nombres de la table III, qui correspondent aux concentrations multiples 1, 2, 3 et 4 si nous prenons comme concentration égale à celle qui correspond à la première tache. Afin que les taches n'augmentent pas de grosseur sur la ligne d'origine on doit déposer la goutte (1,6 μ l) avec un soin extrême et on ne doit ajouter les autres parties successives de 1,6 μ l que lorsque le premier dépôt est parfaitement sec. En travaillant correctement, l'on peut obtenir des multiples très facilement, sans que la largeur des

taches augmente, mais la longueur oui, c'est-à-dire le diamètre vertical, ce que l'on désire justement.

TABLE III

(longueur des taches en cms.)

Concentration	Mélange (1+2+3+4+5)	Lactose	Rafinose
1 (1,6)	3,7	1,5	1,5
2 (2 fois 1,6)	4,2	2,0	1,8
3 (3 fois 1,6)	4,4	2,5	1,8
4 (4 fois 1,6)	4,6	2,6	1,3

La représentation graphique des valeurs de la table III nous proportionne la figure 2 dans laquelle nous avons une équation, comme chez FISHER, PARSONS et MORRISON (9); GIBBONS et BOISSONAS (11), du type :

$$l(\text{longueur de la tache}) = f \cdot \log C(\text{concentration}) + b$$

ou bien : $C = 10^{\frac{l - b}{f}}$
 qui nous définissent la longueur des taches et dans laquelle f et K sont des constantes expérimentales qui entrent implicitement dans le graphique de la figure 2.

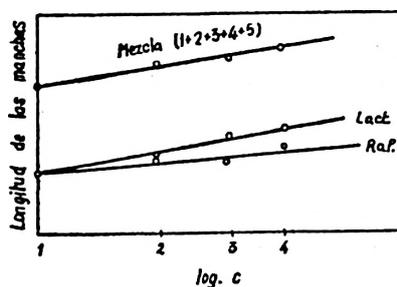


Figure 2

Fonction linéaire entre la longueur ou diamètre vertical des taches sur le chromatogramme et le logarithme de la concentration du sucre.

d) *Séparation chromatographique des sucres dans les produits naturels.*

Dans la figure 3 on peut voir les chromatogrammes des sucres purs (arabinose, glucose, manose, saccharose, lactose et fructose) et de leur mélange à tous, obtenant dans ce cas une séparation partielle en deux fractions (une fraction = arabinose + glucose + manose + saccharose + fructose ; on identifie l'autre comme lactose).

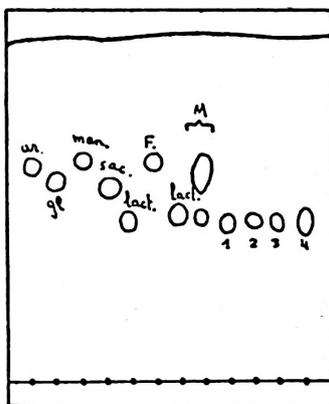


Figure 3

Chromatogramme des sucres purs et de lactose du lait, prouvant que ce dernier n'est pas altéré ni par les ions inorganiques du lait naturel, ni par l'acide borique en saturation.

ar = arabinose, gl = glucose, man = mannose, sac = saccharose, lact = lactose, F = fructose, M = mélange de tous ensemble. Le mélange est au 1 % (p:v) pour chaque composant, de même que les autres solutions simples de sucres.

1, 2, 3 et 4 = taches de lactose naturel.

1 = 2 μ l de café au lait sans sucre.

2 = café au lait et BO_3H_3 à saturation (1.6 μ l).

3 = café au lait (3 μ l).

4 = 5 μ l.

Papier Whatman n.° 1. Dissolvant: acétate d'éthylepyridine-eau. Révélateur: phthalate d'aniline. Temps: 21 heures. Température: 17° C.

Les taches 1, 2, 3 et 4 de la même figure correspondent au lactose naturel de lait de vache. Ce sucre se trouve dans la proportion de 4.5 à 5 % [NITSCHKE (22), WINTON et WINTON (35)] dans les circonstances normales, et dans les circonstances de notre expérience on le voit clairement bien qu'il soit mélangé au hasard avec du café ; on n'observe aucune per-

TABLE IV

Constantes chromatographiques de sucres purs et lactose du lait
 Papier Whatman n.° 1. Acétate d'éthyle-piridine-eau (données dans
 la figure 1). Température 17° C.

Sucre	Quotient	Rf	RM	RG	RF
Arabinose	21.8	0.62	-0.2213	1.051	1.001
	34.9				
Glucose	20.8	0.59	-0.1656	1.000	0.952
	35				
Manose	22.2	0.63	-0.2361	1.064	1.003
	35.1				
Saccharose	19.8	0.56	-0.1092	0.947	0.901
	35.2				
Lactose	16.4	0.47	+0.0573	0.784	0.746
	35.4				
Fructose	22.1	0.62	-0.2204	1.051	1.000
	35.4				
		0.47	+0.0464	0.796	0.758
Lactose (M)		0.47	+0.0588	0.784	0.746
Lactose (1)	16.3	0.46	+0.0618	0.781	0.743
	35.1				
Lactose (2)	16.4	0.47	+0.0686	0.782	0.744
	35.3				
Lactose (3)	16.5	0.47	+0.0472	0.793	0.755
	35				
Lactose (4)	16.5	0.47	+0.0464	0.796	0.757
	34.9				

turbation dans le chromatogramme, ni à cause des ions ni à cause des substances étrangères. La tache 2 se produit comme la tache 1, mais en y ajoutant de l'acide borique en excès, sans que pour cela il se produise de grandes différences. On réalisa la tache 3 comme la tache 1 avec un volume un peu plus grand et la tache 4 correspond à un volume 2 fois 1/2 plus grand que

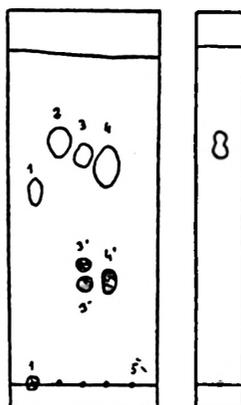


Figure 4

Chromatogramme des glucides de quelques produits et aliments courants (avec protéines et acides aminés simultanément).

1 = lactose, 1' = protéines du lait.

2 = sucre du vin de Xérès (Jerez Pálido de Romero Gil).

3 = sucre du jus d'orange, 3' et 3'' acides aminés de l'orange (endocarpe).

4 = jus de cerise, 4' = acides aminés du jus de cerise.

5 = café noir et sans sucre.

Anexe = Glucides du jus d'abricot.

Quantité prise à origine: 3 μ l. Dissolvant: acétate d'éthyle-pyridine-eau. Papier: Whatman n.° 1. Révélateurs: Phtalate d'aniline (en blanc), et ninhydrine (rayé). Temps: 21 heures. Température, 21° C.

la tache 1. On a répété les chromatogrammes simultanés de façon plus ou moins capricieuse en vue de donner une valeur critique aux résultats, étant donné que leur propre constance démonte la non influence de la variable ou facteur «distance des bords», dans le chromatogramme cylindrique.

Dans la table IV nous enregistrons les diverses valeurs des constantes chromatographiques. On déduit dans cette table la constance du Rf pour le sucre de lait dans les diverses circonstances mentionnées, et ainsi on vérifie l'indépendance et la concordance des résultats obtenus.

Dans la figure 4 on peut voir les chromatogrammes du lait

(1 avec les protéides), du vin de Xérès (2), du jus d'orange (3), avec ses mono-peptides (3' et 3''), du jus de cerise (4) avec les siens (4') et de l'extrait de café (5). La figure annexe présente le chromatogramme obtenu avec le jus d'abricot.

Dans ce chromatogramme 1, 1' (fig. 4) on observe dans les taches correspondants aux protéines, que celles-ci apparaissent séparément de façon rudimentaire en deux zones concentriques. Ce type de chromatogramme pourrait donc servir pour juger de l'état biochimique dans son ensemble, d'un échantillon de lait.

Le chromatogramme 3, 3', 3'' (fig. 4) correspond au jus de l'endocarpe de l'orange.

Nous n'avons pas identifié les acides aminés (3' et 3'', fig. 4) car les valeurs des Rf correspondantes nous manquent.

Dans la bibliographie l'on trouve les données suivantes en relation avec cet important problème : SCURTI et PLATO (31) séparèrent du jus d'orange les acides aminés asparragine et glutamine. YOSHIMURA (36) identifia la staquidrine (0.75 %) et la bétaine. NELSON, MOTTERN et EDDY (20) démontrent que l'arginine, la coline et l'acide spartique sont composant du jus d'orange (Floride, Valencia) et finalement SINCLAIR, BARTHOLOMEW et NADVIDEK (30) trouvent la cistine et la lisine.

Selon BRAVERMAN (4) le contrôle de ces substances azotées serait intéressant en relation avec les protéines et les sucres, pour juger du degré de conservation des jus commerciaux d'orange. WILSON attribua le brunissement des jus de fruits à la formation de mélanoidines, les acides aminés et les glucides intervenant de façon active, mais NELSON et ses collaborateurs (20) ne trouvent pas justifié le fait que les protéines soient directement responsables des altérations organoleptiques des jus de fruits [DANEHY et PIGMAN (7) ; SABRODSKI et VITKOVSKAIA (27)].

e) *Hydrolyse chimique de l'amidon.*

On a suivi les indications de FLOOD, HIRST et JONES (10) en modifiant convenablement certains détails, étant donné que dans notre cas une hydrolyse quantitative et rapide ne nous intéresse pas mais plutôt retardée, afin d'obtenir une hydrolyse légère et graduelle. Selon ces auteurs, on hydrolyse 10 mg. d'amidon avec 0.5 cc. de SO_4H_2 1N, chauffant au bain-marie pendant 6 heures ; on ajoute Co_3Ba jusqu'à neutralisation par rapport au papier rouge congo, on centrifuge et on travaille avec le liquide qui surnage.

Afin de retarder l'hydrolyse, la rendant différentielle pour

qu'on puisse l'observer grâce à la chromatographie sur papier, l'on pensa aux lois fondamentales de la chimie cynétique ; pour cela, l'on diminua la température du bain-marie à 90° et l'on prit la quantité prescrite d'acide (0.5 m. eq.), mais en ajoutant 1 cc. d'empois à 2 % l'on changea les concentrations du système total. Et la concentration d'amidon dans notre expérience est donc égale à 13,3 mg/cc. La normalité de l'acide actif descendit à 0,33.

TABLE V

Constantes chromatographiques de glucides extraits de la Nature
(comme on le voit dans la figure 4)

Produit essayé	Type de substance	Référence au chromatogramme	Rf	Rf corrigé à 17° C.	Identification
Lait	Sucre	1	0.58	0.47	Lactose
>	Protéines	1'	0.00	0.00	Protéines
Vin	Sucre	2	0.70	0.57	D-Glucose
Orange	Sucre	3	0.69	0.56	Saccharose
>	Acides aminés	3'	0.33	—	—
>	> >	3''	0.29	—	—
Cerise	Sucre	4	0.66	0.54	—
>	Acides aminés	4'	0.31	—	—
Café (extrait)	—	5	—	—	—
Abricot	Sucre	Annexe	0.73	0.59	D-Fructose
>	>	>	0.70	0.56	Saccharose

Comme on peut le voir facilement, non seulement l'activité du catalyseur a diminué, mais aussi la concentration du substratum.

De ses données l'on peut déduire que la vitesse d'hydrolyse dans ce travail est d'un ordre 5 fois plus petit que dans les conditions de Flood (sans tenir compte dans cette appréciation de l'influence de la température qui est aussi plus petite dans notre cas). La figure annexe (figure 5) correspond au chromatogramme obtenu. Les quatre premiers déroulements sont ceux du maltose, le glucose, le mélange (maltose + glucose + amidon) et amidon sans être hydrolysé. Pour le glucose et le maltose, on plaça sur la ligne d'origine 2 μ l (20 μ g) et pour l'amidon le même volume (ce qui équivaut à 40 μ g). Sur la ligne d'origine des points restants et en abscisse l'on mit

3 μ l du produit hydrolysé surnageant, après l'avoir neutralisé avec CO_3Ba comme il est dit plus haut. Si l'on considère la table précédente et grâce à un simple calcul d'arithmétique, on déduit que 3 μ l du produit hydrolysé contiennent les restes hydrolysés d'une somme initiale de 40 μ g d'amidon. Cela équi-

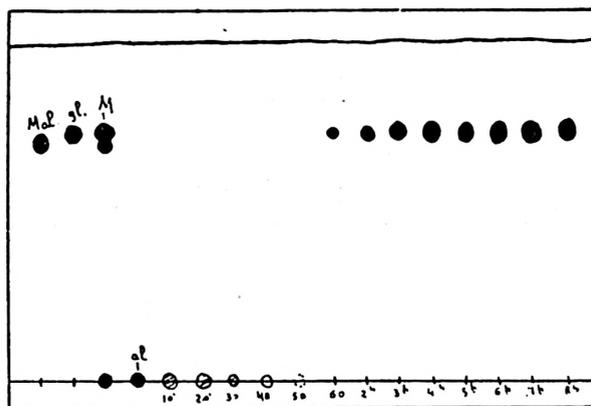


Figure 5

Chromatographie sur papier de l'hydrolyse chimique de l'amidon.

Mal = maltose au 1 % (p:v).

gl = glucose au 1 % (p:v).

M = mélange (gl+mal+al).

al = amidon 2 % (p:v).

Volume pris 2 μ (2 μ pour l'hydrolyse).

Dissolvant: Acétate d'éthyle-pyridine-eau.

Révéléateur: Phtalate d'aniline pour les sucres et iode pour l'amidon.

Temps: 21 heures. Température: 21° C.

vaut rigoureusement à la quantité d'amidon sans être hydrolysé que l'on mit comme terme de comparaison. De cette manière l'on obtint l'uniformité quantitative. Les nombres mis en abscisse correspondent aux temps d'hydrolyse en minutes pour les fractions d'heure et en heures pour les multiples jusqu'à un maximum de 8 heures.

Comme on peut le voir dans la figure 5 on observa le déplacement des sucres patrons de même que la parfaite séparation du mélange glucose + maltose + amidon.

L'amidon ne présenta aucun déplacement ($R_f = 0$) et il donna une tache bleue foncée avec le réactif iodé.

Les taches sur la ligne d'origine correspondent à l'amidon et aux dextrans : la couleur caractéristique de l'amidon disparaît peu à peu pour donner naissance à celle des dextrans.

Finalement l'on n'obtient plus aucune coloration avec liode après 10 mns d'hydrolyse une tache bleue violacée apparait, ce qui démontre que dans les conditions mentionnées, et pendant le temps indiqué l'amidon originellement intact ou amidon proprement dit n'existe plus, tout au plus un mélange d'amilodextrine, eritrodextrine et amilopectine. Après 30 mns, l'on trouve encore des indices d'amilopectine et de dextrines résiduelles, qui ont une couleur brun rougeâtre. Après 40 et 50 mns nous voyons une couleur rougeâtre très pâle et après 60 mns on n'aperçoit plus aucune couleur qui dénote la présence des dextrines colorables. Probablement il doit exister encore des dextrines nommées «non colorables» (acrodextrines), mais celles-ci n'ont pas manifesté leur présence avec les réactifs employés. On n'arriva pas à isoler le maltose ni à l'identifier chromatographiquement, seulement dans la preuve en blanc. Au contraire on identifia le glucose qui constitue la série de taches apparues aussitôt après une heure d'hydrolyse. Ces taches augmentent progressivement en extension, à mesure que augmente la concentration du sucre formé dans le processus hydrolytique.

Théoriquement on pourrait obtenir un indice de la vitesse de réaction dans un intervalle quelconque de l'expérience, trouvant la valeur du quotient :

$$\frac{\Delta l}{\Delta t} = \frac{l_2 - l_1}{t_2 - t_1}$$

où l représente la longueur de la tache, t le temps, 1 et 2 l'ordre progressif dans le cas de deux taches successives.

Pour expliquer cette propriété considérons que les produits de l'hydrolyse à température constante, s'accumulent selon l'équation fondamentale :

$$K = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{c_0}{c}$$

et nous avons déjà vu plus haut que la longueur des taches en chromatographie sur papier est une fonction du type :

$$l = f \cdot \log c + b.$$

dans laquelle f et b sont constantes pour un chromatogramme. Cette dernière équation, on peut l'écrire aussi sous la forme :

$$c = c_0 \cdot 2.303 \left(\frac{l - b}{f} \right)$$

Intentons maintenant le calcul de la constante d'Arrhenius pour deux taches successives quelconques, que nous désignons par 1 et 2, pour un processus hydrolytique chromatographique comme dans notre expérience. Alors :

$$K = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \ln \frac{a - x_1}{a - x_2} = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \ln \frac{e - a \cdot 2.303 \left(\frac{l_1 - b}{f} \right)}{a - e \cdot 2.303 \left(\frac{l_2 - b}{f} \right)}$$

où t est la concentration initiale de substratum. Cette dernière expression nous pouvons l'écrire aussi en la simplifiant sous la forme suivante :

$$\begin{aligned} K &= \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \ln \frac{1 - \frac{1}{a} \cdot e^{2.303 \left(\frac{l_1 - b}{f} \right)}}{1 - \frac{1}{a} \cdot e^{2.303 \left(\frac{l_2 - b}{f} \right)}} \approx \\ &\approx \frac{1}{t_2 - t_1} \left[-\frac{1}{a} e^{2.303 \left(\frac{l_1 - b}{f} \right)} + \frac{1}{a} e^{2.303 \left(\frac{l_2 - b}{f} \right)} \right] \\ &= \frac{1/a}{t_2 - t_1} \left[e^{2.303 \left(\frac{l_2 - b}{f} \right)} - e^{2.303 \left(\frac{l_1 - b}{f} \right)} \right] \\ &\approx \frac{1/a}{t_2 - t_1} \left[2.303 \left(\frac{l_2 - b}{f} \right) - 2.303 \left(\frac{l_1 - b}{f} \right) \right] \approx \\ &\approx \frac{2.303}{a f} \cdot \frac{l_2 - l_1}{t_2 - t_1} = \frac{2.303}{a f} \cdot \frac{\Delta l}{\Delta t} \end{aligned}$$

où il faut considérer le déroulement en série de Taylor et Mac-Laurin dans les calculs indiqués, en appliquant la théorie des approximations binomiales.

Pour les réactions de 2.^o et 3.^o ordre, nous sommes arrivés grâce à un calcul un peu plus compliqué, aux expressions :

$$K_2 = \frac{2.303}{a^2 f} \cdot \frac{\Delta l}{\Delta t} \quad \text{et} \quad K_3 = \frac{2.303}{a^3 f} \cdot \frac{\Delta l}{\Delta t}$$

Ainsi nous rencontrons cette propriété des diagrammes chromatographiques, et nous la soulignons, qui peut servir a

posteriori comme critérium de précision pour juger si un chromatogramme est bien réalisé. Le quotient $\frac{\Delta l}{\Delta t}$ doit être en principe et théoriquement une quantité constante pour chaque expérience et dans un système chimique homogène. Avec ce concept on pourrait estimer même la vitesse du processus que l'on étudie à chaque moment, puisqu'il est toujours facile de calculer la masse active de substratum, connaissant les produits auxquels elle a donné naissance. Une condition essentielle dans ces considérations est que le chromatogramme et les techniques de préparation soient parfaites, en vue de diminuer les erreurs expérimentales et celles qui sont propres à la méthode.

TABLE VI

Temps (heures)	Hauteur des taches (en mm.)	Δl (en mm.)	$\frac{\Delta l}{\Delta t}$ (mm/mn)
1	9.5	—	—
2	13.5	4.0	0.067
3	17.0	3.5	0.058
4	20.5	3.5	0.058
5	20.0	—	—
6	19.0	—	—
7	20.0	—	—
8	20.0	—	—

Pour appliquer cette propriété considérons la table annexe que l'on a obtenue avec les données de l'original correspondant à la figure 5. Dans cette table on peut vérifier que les valeurs de $\frac{\Delta l}{\Delta t}$ restent sensiblement constantes jusqu'à la quatrième heure et comme les taches de glucose ne s'agrandissent plus ensuite, pratiquement l'hydrolyse n'avance plus, bien que le traitement se prolonge. C'est-à-dire que le quotient $\frac{\Delta l}{\Delta t}$ ne peut s'appliquer valablement car alors la vitesse de réaction a diminué beaucoup, et les oscillations sont plus grandes que la précision de la valeur de K.

Dans ce chromatogramme on n'a pas calculé les Rf puisqu'on identifie sans aucune espèce de doute le produit formé,

en tenant compte des avancées des substances dans les chromatogrammes type.

f) *Etude de l'activité amilasique de la pomme de terre.*

On peut rendre évidente l'action amilasique grâce aux procédés basés sur les principes suivants :

1. Mesure de la concentration du substratum, qui diminue peu à peu de même que sa viscosité.
2. Variations de la couleur obtenue avec l'iode (HOSKAM (12), ZANKER et REITHOL (37).
3. Degré d'hydrolyse et
4. Variations dans les produits de l'hydrolyse (MYRBACK et NEUMÜLLER (19).

TABLE VII

Caractéristiques du système	Déduction des conditions selon Flood et collaborateurs	Dans ce travail
Amidon employé	10 mg.	20 mg.
Volume total	0.5 cc.	1.5 cc.
Concentration de l'amidon	20 mg/cc.	13.3 mg/cc.
Acide ajouté	0.5 meq.	0.5 meq.
Normalité résultante de l'acide	1	0.33

Pour réaliser ce travail, l'on pensa à la chromatographie sur papier puisqu'elle présente, avec une sensibilité plus ou moins grande, tous les avantages des procédés indiqués avec en plus sa plus grande simplicité. Ni dans la bibliographie des amilases, ni dans la littérature de la chromatographie sur papier, il n'y avait une investigation de cette nature et cela nous poussa à l'appliquer dans ce sens et en poursuivant les buts dits plus haut.

On admet deux types fondamentaux d'amilases : les α amilases ou dextrinogènes et les β amilases ou saccharogènes (OHLSSON, 23). Les premières exercent leur action en rompant les molécules de substratum dans un point intérieur de la molécule, en produisant de préférence des dextrines. Les secondes donnent naissance à la β -maltose et leur point d'attaque réside aux extrémités finales des molécules de substratum. Dans la

Nature elles se présentent en général mêlées et même à côté de glucosidases. Leurs effets amilolitiques sont dans ce cas beaucoup plus rapides, démontrant ainsi qu'elles forment un système enzymatique naturel, biochimiquement inséparable et jouissant d'une action mutuelle complémentaire. Les actions α et β se distinguent aussi par la diffusion sur des plaques de agar-amidon, en révélant avec de l'iode [RUGE (26)]. On a travaillé intensément à la séparation de amilases α et β par adsorption. Par exemple : WALDSCHMIDT-LEITZ et cols (34), BALLS et cols, 1946, BALLS et cols (i), SCHWIMMER et BALLS (28) sur des tubercules divers.

Si l'on dispose d'un mélange d'amilases α et β la destruction de l'une d'elles est possible. OHLSSON (23) rendit évident le fait qu'en traitant par des solutions acides (pH 3.3) un tel mélange, on détruit l'amilase α . KNEEN, SANDSTEDT et HOLLENBEEK (17), KNEEN et BECKORD (6) découvrirent que l'on peut détruire l'amilase β du malt en chauffant à 70° C pendant 15 minutes surtout en présence d'ions de calcium et à un pH de 6-7.

Le meilleur pH pour l'action amilasique de la pomme de terre est de 6.95-7.00 [DOBY et BURGER (8)]. Comme amortisseurs, les plus indiqués sont les phosphates ou mélanges d'acétate-phosphate [MYRBACK et NEUMÜLLER (19, 32)].

On effectua la réaction dans des tubes à hémolyse pourvus de bouchons très bien ajustés, selon la distribution suivant :

TABLE VIII

	Essai I	Essai II	Essai III
Amidon	1 cc.	1 cc.	1 cc.
Extrait avec l'enzyme (pH=7)	1 cc.	1 cc. (chauffé)	1 cc. (1/10)
CINa 0.2 n.	0.1 cc.	0.1 cc.	0.1 cc.
Chloroforme	3 gouttes	3 gouttes	3 gouttes

Le volume total est toujours le même dans tous les cas (2-1 cc. + le chloroforme). On fabriqua l'extrait chauffé (essai 2)

d'après KNEEN et cols. On prépara l'extrait dilué (essai 3) en mélangeant 1 c. c. de l'extrait original frais et 9 c. c. de phosphate pH = 7 et en prenant un 1 c. c. de ce mélange.

On ajouta l'extrait enzymatique au dernier moment et l'on plaça les tubes dans une étuve à 37° C.

Dans les figures 6, 7 et 8 l'on observe la distribution des échantillons sur la ligne d'origine.

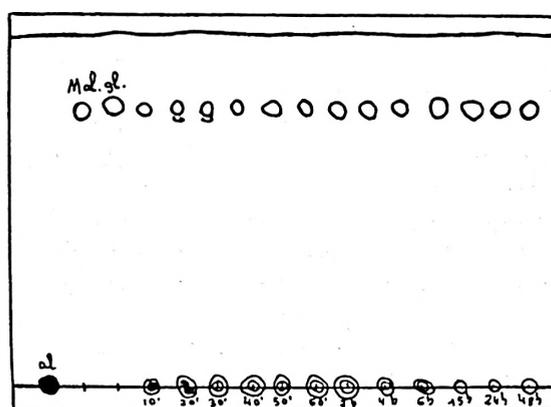


Figure 6

Activité amilasique de la pomme de terre variété Sergen (espagnole), enregistré par chromatographie sur papier.

Mal = maltose à 1 % (p:v), 16 μ g.

gl = glucose à 1 % (p:v), 16 μ g.

al = amidon à 2 % (p:v), 28 μ g.

Dissolvant: acétate d'éthyle-pyridine-eau.

Révélateurs: phtalate d'aniline pour les sucres et iode pour l'amidon et les dextrines.

Temps: 21 heures.

Température: 25,2° C.

al correspond à l'amidon pur (1'4 μ l. de la solution à 2 % p : v, ce qui équivaut à 28 μ g.).

Mal et *gl* correspondent respectivement au maltose et au glucose (1'6 μ l. de la solution à 1 % p : v, ce qui équivaut à 16 μ g. de chacun).

Les indications restantes expriment les temps de réaction enzymatique. Le volume pris dans ce cas est de 3 μ l. ce qui équivaut à 28'6 μ g. d'amidon sans être hydrolysé.

On rend inactifs sur la ligne d'origine du papier Whatman les micro-échantillons que renferment encore des quantités d'en-

zyme actif, en y ajoutant au préalable 3 μ l. de $(CN)_2Hg$ 0'01 M qui se comporte comme inhibiteur irréversible. L'on a proposé dans la bibliographie le Cl_2Hg [Bealing et Bacon (2)] mais nous avons choisi le cyanure qui est encore moins polaire.

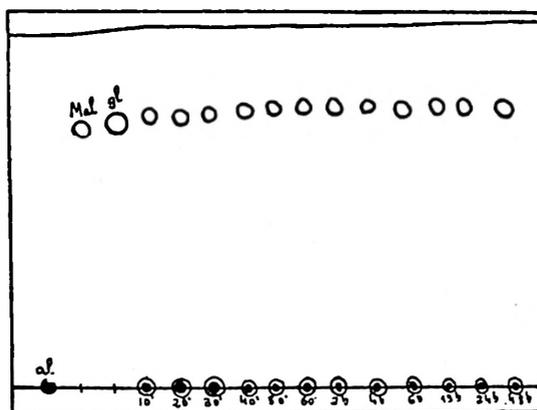


Figure 7

Effet α -amylasique de la pomme de terre espagnole variété Sergen.
Mêmes données que dans la figure 6, à part le temps 21 heures et la température 25,2° C.

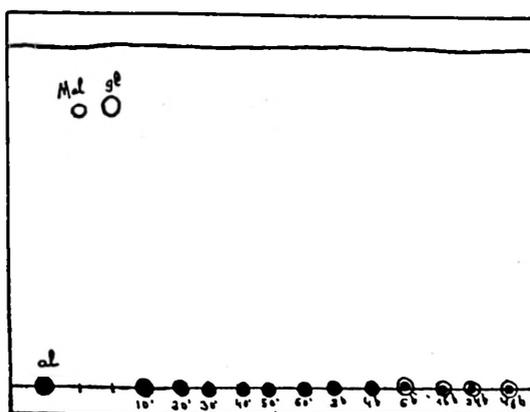


Figure 8

Activité amylasique de l'extrait phosphaté de pomme de terre dilué à 1/10.
Mêmes données que dans les figures 6 et 7, à part le temps 21 heures et la température 27,4° C. Explications dans le texte.

1. — *Résultats de l'essai 1. Activité amilasique de la pomme de terre variété Sergen (espagnole).*

Dans ce chromatogramme (fig. 6) on observe la dégradation de l'amidon et sa transformation en maltose et en glucose.

En révélant à l'aide d'iode, on observe les colorations suivantes :

TABLE IX

	Partie centrale	Couronne
Solution patron (0 minute)	bleu foncé	
10 minutes	bleu	violet
20 minutes	bleu (moins foncé)	violet
30 minutes	violet	rougeâtre
40 minutes	violacé	rougeâtre

On interprète ce processus par la dégradation des molécules du substratum chez les amiloses, les eritrodextrines et les dextrines résiduelles.

2. — *Résultat de l'essai 2. Activité de l'amilase α de la pomme de terre.*

Dans ce chromatogramme l'on observe (lg. 7) la dégradation de l'amidon selon une marche différente dans son ensemble (comparer avec la figure précédente).

Après le traitement à 70° C, 15 minutes, l'activité enzymatique subsiste, mais très diminué (observer la persistance de dextrines à côté de l'amidon résiduel non attaqué). Le sucre réducteur apparaît légèrement diminué.

Les colorations avec l'iode sont aussi graduelles que dans le cas précédent, mais leur persistance indique que la diminution de l'activité de l'amilase β fait apparaître des produits qui n'ont pas le temps d'être éliminés. La caractérisation chromatographique de ces poliholosides, que l'on devrait plutôt nommer capillaire car ils ne souffrent aucun déplacement ($R_f=0$) se manifeste dans le cas où agit l'amilase α par la production rapide de dextrines au début, mais ensuite l'hydrolyse de ces dextrines se modifie à peine.

3. — Résultats de l'essai 3. *Activité amilasique l'extrait phosphate de pomme de terre dilué à 1/10.*

Dans ce chromatogramme (fig. 8) l'on observe un retard très grand dans l'activité amilasique.

En révélant avec de l'iode, on observe des colorations analogues. Cependant les dextrines n'apparaissent pas avant la quatrième heure ; elles commencent seulement à se manifester après le sixième heure d'incubation. Nous nous trouvons encore dans les mêmes conditions — pour les dextrines — après 48 heures, que dans le diagramme normal après 6 heures, et sans que des molécules de sucre réducteur aient apparu.

g) *Effet inhibiteur des ions F^- et Ca^{++} de même que de l'acide ascorbique sur l'activité amilasique de la pomme de terre:*

Comme dans les essais précédents l'on fit agir l'enzyme sur le substratum, dans des tubes à hémolyse bouchés hermétiquement. Dans chaque série de tubes l'on plaça les composants suivantes :

TABLE X

	Essai I	Essai II	Essai III
Amidon à 2 % phosphate a pH=7.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
Extrait a vec le ClNa 0.2n	1 cc.	1 cc.	1 cc.
FNa (conc. résultante) g/100 cc.	0.1 cc. 0.48 %	0.1 cc. —	0.1 cc. —
Acide scorbique	—	0.05 %	—
Cl_2 , Ca	—	—	0.05 %
Chloroforme	3 gouttes	3 gouttes	3 gouttes

On dissout le FNa, le Cl_2Ca et l'acide scorbique dans le ClNa 0'2 n, en proportion telles qu'en mélangeant, l'on obtint les concentrations citées. Les conditions et les techniques restantes furent les mêmes que celles décrivent dans le précédent chapitre.

1. — *Résultat de l'essai 1. Effet inhibiteur des amilases α et β par l'ion fluor.*

Dans ce chromatogramme (fig. 9) l'on observe la persistance des taches d'amidon non attaqué par l'enzyme.

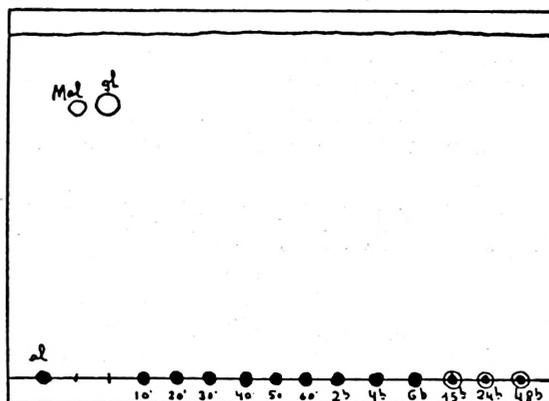


Figure 9

Effet inhibiteur des amylases α et β en présence de l'ion fluor (à la molarité 0.1 M FNa = 4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
Mêmes données que dans la figure 6, à part le temps = 21 heures et la température 26.6° C.

Après 15 heures apparaît l'attaque de l'amylase α et l'on doit donc admettre une action amilasique, bien que très retardée (dans les conditions normales, sans inhibiteur, les dextrines apparaissent dès le premier moment).

Si dans ce chromatogramme il y a un sucre réducteur (glucose, β -maltose) ce doit être en quantités très petites étant donné que les réactifs ne l'accusent pas ; c'est donc pratiquement comme, s'il n'y en avait pas.

2. *Résultats de l'essai 2. Effet inhibiteur de l'acide scor-bique sur les amilases de la pomme de terre.*

Dans le chromatogramme (fig. 10) l'on observe une inhibition générale du processus amilolitique (persistance de la tache bleue de l'iode comme révélateur).

L'effet de l'amylase α se retarde un peu (10 mns.) par rapport au normal, mais l'action persiste ensuite. L'action ne se

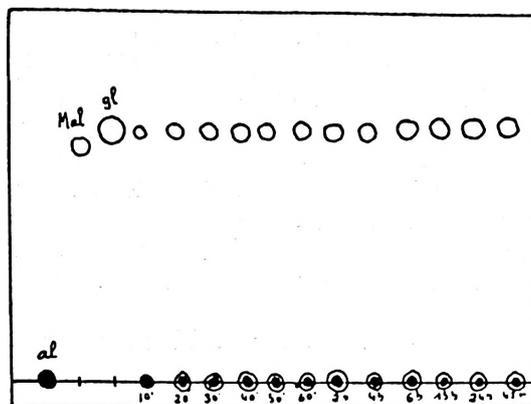


Figure 10

Effet inhibiteur de l'acide ascorbique (0.05 %) sur les amylases de la pomme de terre.

Mêmes données que dans la figure 6, à part le temps 23 heures et la température 29.8° C. (Remarquer le débordement du front. Explications dans le texte (essai n.° 2).

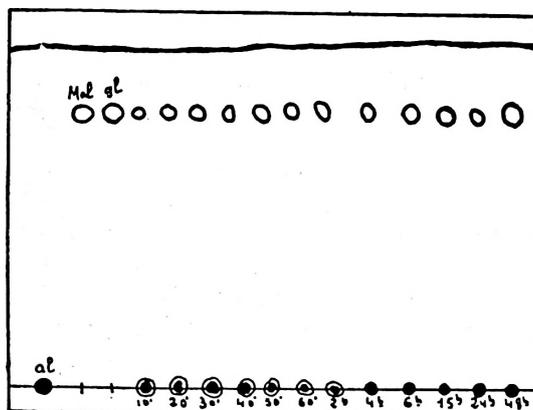


Figure 11

Effet inhibiteur de l'ion Ca sur l'action amylasique de la pomme de terre.

Mêmes données que dans la figure 6 à part le temps 21 heures et la température (24.9° C).
Explications dans le texte (essai n.° 3).

manifeste pas (inhibition) et les taches d'éritrodextrines persistent donc pendant tout le processus (Resultats como Seshagirirao et Giri (29)].

Il existe encore une zone centrale d'amidon après 48 hs. de traitement, quantité qui a diminué un peu depuis le début.

3. *Résultats de l'essai 3. Effet inhibiteur de l'ion calcium sur les amilases de la pomme de terre.*

Dans le chromatogramme correspondant (fig. 11) on observe aussi une inhibition généralisée, bien que moins intense que dans l'essai 5, à juger par la variation de la couleur avec l'iode.

L'effet α apparaît en son temps et on doit attribuer l'apparition des dextrines à l'effet β .

L'action du calcium se limite donc à retarder l'attaque du substratum par le ferment sans pouvoir empêcher son hydrolyse postérieure.

Après 48 heures, des dextrines résiduelles persistent encore (traces d'amilodextrine).

Conclusions

1. — Avec le dissolvant acétate d'éthyle-piridine-eau, les R_f ne varient pas beaucoup lorsqu'on modifie les concentrations absolues et relatives des sucres. On obtient la plus grande sensibilité avec 1'6 μ l. de solution à 1 % (en mélange et en poids : volume).

2. — Grâce au tracé d'une courbe type, l'on peut déterminer la concentration inconnue d'un volume de solution sucrée, en se servant directement de la longueur de la tache correspondante.

3. — L'on sépare les sucres des mélanges naturels (vins, jus de différents fruits, lait, etc.) sans purifier les extraits, même si on ajoute des ions inorganiques et l'acide borique.

4. — On arrive à séparer en même temps sans interférences les acides aminés et les protéines naturelles.

5. — Dans un processus hydrolytique chromatographié, l'on projecte le calcul de la constante de vitesse d'Arrhenius.

6. — La distinction des actions amilasiques de type α et β ou de leur mélange est possible.

7. — L'on contrôle des phénomènes d'inhibition amilasiques, et l'on peut apprécier le type d'inhibition α ou β .

Reference

- (1) BALLS, A. K., THOMPSON, R. R., et WALDEN, M. K. : *J. Biol. Chem.*; 163, 571, 1946, y 173, 9, 1948.
- (2) BEALING, F. J., et BACON, J. S. D. : *Bioch. J.*; 2, 227, 1953.
- (3) BLOCK, R. J. R., LESTRANGE et G. ZWEIG : *Paper Chromatography*. AP. Inc. New York, 1952.

- (4) BRAVERMAN, J. B. S. : Citrus products. Intersc. New York, 1949.
- (5) BREDERECK, H. : Ber, 64 B, 2856, 1931, y 65 B, 1110, 1932.
- (6) CRAMER, F. : Papier Chromatographie. Verlag Chemie. Weinheim. 1953.
- (7) DANEHY, J. P., et PIGMAN, W. W. : *Adv. in Food Research.*; **3**, 241, 1951.
- (8) DOBY et BURGER : *Fermentforsch.*; **13**, 209, 1932.
- (9) FISHER, R. B., PARSON, D. S., et MORRISON, G. A. : *Nature*; **161**, 764, 1948.
- (10) FLOOD, A. L., HIRST, E. L. et JONES, J. K. N. : *J. Chem. Soc.*; 1679, 1948.
- (11) GIBBONS, G. C., et BOISSONAS, R. A. : *Helv. Chem. Acta*; **33**, 1477, 1950.
- (12) HOSKAM, E. G. : *Bioch. et Biophys. Acta*; **1**, 419, 1947.
- (13) ISHERWOOD, F. A. : *British Medical Bulletin*; **3**, 202, 1954.
- (14) JERMYN, M. A. et ISHERWOOD, F. A. : *Biochem. J.*; **44**, 402, 1949.
- (15) KOWKABANY, G. N. : *Adv. Carbohydrate Chem.*; **9**, 303, 1954.
- (16) KNEE, E., et BECKORD, L. D. : *Arch. Biochem.*; **10**, 41, 1946.
- (17) KNEEN, E., SANDSTEDT, R. M., et HOLLENBECK, C. M. : *Cereal Chem.*; **20**, 399, 1943.
- (18) MORENO CALVO, J. : *Anales de Bromatologia*; **7**, 107, 1955; **7**, 95, 1955; autre, 1955 (sous presse); *Euclides*, **168**, 47, 1955, **173**, 208, 1955; *Revista Ciencia Aplicada*, 1955, 399.
- (18 a) MORENO CALVO, J., et SANTOS RUIZ, A. : *XXVIII Cong. Int. Química Industrial*, 1955 (sous presse).
- (19) MYRBACK, K., et NEUMULLER, G. B., et SÜMNER-MYRBACK, V. : *The Enzymes*, A. P. Inc. New York, 1950.
- (20) NELSON, E. K., MOTTERN, H. H., et EDDY, C. W. : *Fruit Prod. J.*; **12**, 231, 1933, V. Braverman.
- (21) NIELSEN, G. P. : *Ind. Chem. Ind.*; **15**, 177, 1943.
- (22) NITSCHKE, A. : *Physiologie und Pathologie der Ernährung des Säuglings*. V. Lang-Shoen. Die Ernährung. Springer, 1952.
- (23) OHLSSON, E. : *Z. physiol. Chem.*; **189**, 17, 1930.
- (24) PARTRIDGE, S. M. : *Nature*; **158**, 270, 1946; **164**, 443, 1949.
- (25) ROMINSKI, I. R., et SUSCHKOWA, A. S. : *Biokhímia*; **3**, 261, 1954.
- (26) RUGE : *Übungen zur Wachstums und Entwicklungsphysiologie der Pflanze*. Springer-Berlin, 1951.
- (27) SABRIDSKI, A. G., et VITROSKAYI, V. A. : *Biochimia*; **6**, 738, 1954.
- (28) SCHWIMME, R. S., et BALLS, A. K. : *J. Biol. Chem.*; **176**, 465, 1948.
- (29) SESHAGIRIRAO, P., et GIRI, K. V. : *Proc. Acad. Sci.*; **16 B**, 190, 1942.
- (30) SINCLAIR, W. B., BARTHOLOMEW, E. T., et NADVIDEK, R. D. : *J. Agr. Research*; **50**, 173, 1935.
- (31) SCURTI, F., et PLATO, G. : *Staz. Sper. Agric. Ital.*; **41**, 435, 1908. V. Braverman.

- (32) SUMNER, J. B., et MYRBACK, K. : *The Enzymes* , vol. 1, part. 2, A. P. Inc. New York, 1951.
- (33) UDRANSKY, L. V. : *Z. phys. Chem.*; **12**, 355, 1888.
- (34) WALDSCHMIDT-LEITZ, E., REICHEL, M., et PURR, A. ; *Nature*; **20**, 254, 1932.
- (35) WINTON, A. L., et WINTON, K. B. : *Structure and composition of foods*. III. Wiley. New York, 1949.
- (36) YOSHIMURA, K. : *Bull. Kagoshima Imp. Col. Agr. For.*; **3**, 1, 1918.
- (37) ZINKER, E., et REITHEL, F. J. : *J. Lab. Clin. Med.*; **34**, 1312, 1949.