

sie ein. Der Rückstand wird aus Essigester-Hexan umkrystallisiert und schmilzt dann bei 194—195°.

Zur Analyse trocknet man bei 90° im Hochvakuum.

3,558 mg Subst. gaben 10,372 mg CO₂ und 2,870 mg H₂O
C₂₇H₃₆O₃ Ber. C 79,37 H 8,88%
Gef. „ 79,55 „ 9,03%

D-Homo-androstanon-(3)-ol-(17a).

(D-Homo-dihydro-testosteron).

120 mg D-Homo-androstanon-(3)-ol-(17a)-benzoat werden in 8 cm³ 4-proz. methanolischer Kalilauge 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Dann wird in Wasser gegossen, das ausfallende D-Homo-dihydro-testosteron abgenutscht und mehrmals aus Essigester-Hexan umkrystallisiert. Smp. 187—189°.

Zur Analyse wird bei 85° im Hochvakuum getrocknet.

3,640 mg Subst. gaben 10,516 mg CO₂ und 3,46 mg H₂O
C₂₀H₃₂O₂ Ber. C 78,89 H 10,59%
Gef. „ 78,84 „ 10,65%

Die Analysen sind in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung *H. Gubser*) ausgeführt worden.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

104. Recherches sur l'amidon II¹⁾.

Sur la nonhomogénéité de l'amidon

par Kurt H. Meyer, W. Brentano et P. Bernfeld.

(28. VI. 40.)

Il y a environ 10 ans, à la suite de travaux sur diverses autres substances hautement polymérisées, l'un de nous a apporté en collaboration avec *H. Hopff* et *H. Mark*¹⁾ une contribution à l'étude de la constitution de l'amidon. *Irvine* et *Macdonald*²⁾ ainsi que *Haworth*³⁾ avec ses collaborateurs avaient montré dans des travaux fondamentaux que la molécule de l'amidon contenait probablement une chaîne formée de radicaux α -1,4-glucosiques; nous avons pu appuyer cette interprétation par l'analyse de l'activité optique de l'amidon au moyen de la règle de *Hudson* ainsi que par une étude de la cinétique de la dégradation par les acides. Des travaux très fouillés de *Freudenberg*⁴⁾ ont modifié sur quelques points de détail

¹⁾ Premier mémoire: B. **62**, 1103 (1929).

²⁾ Soc. **1926**, 1502.

³⁾ Soc. **1928**, 2681.

⁴⁾ B. **63**, 1510 (1930).

notre argumentation, tout en confirmant sur tous les points essentiels nos conclusions, d'après lesquelles les liaisons sont formées d'une manière tout à fait prépondérante par des liaisons α 1,4 (liaisons maltosiques) et les liaisons β sont absentes ou en tout cas très peu nombreuses. Mais l'étude de la viscosité de solutions d'amidon ainsi que celle des propriétés mécaniques des films obtenus avec des dérivés de ce corps a montré qu'une formule à chaîne non ramifiée n'est pas satisfaisante. Dans notre monographie consacrée aux principes immédiats hautement polymérisés¹⁾, nous sommes alors arrivés à la conclusion: « que nous n'avons pas uniquement de longues chaînes maltosiques filiformes, mais que ces chaînes doivent présenter en certains endroits des ramifications ou des réticulations. »

Après plusieurs années d'interruption, nous avons repris en 1935 l'étude expérimentale de l'amidon. Avant tout, nous désirions résoudre les questions soulevées dans le temps au sujet des ramifications et des réticulations de la molécule de l'amidon ainsi que de leurs relations avec les propriétés colloïdo-chimiques de cette substance. Nous nous rendions par ailleurs parfaitement compte de ce que les propriétés de colloïde de l'amidon: gonflement, vieillissement, formation d'empois, hydrolysabilité par les ferments, ne sauraient être interprétées uniquement au moyen de considérations chimiques. Comme l'a montré l'étude de la cellulose, cette interprétation demande le concours de considérations morphologiques sur le genre du réseau, la grandeur des micelles ainsi que leur disposition, etc.

On sait que l'amidon est loin de présenter l'homogénéité de la cellulose. Le simple traitement à l'eau chaude permet déjà d'extraire des grains d'amidon une substance soluble dans l'eau chaude, qui se trouve avant tout à l'intérieur des grains. Mais la majeure partie de la substance des grains n'est pas du tout soluble dans l'eau bouillante; ils s'imbibent d'une quantité limitée d'eau; ils grossissent sans se dissoudre et se transforment en des « vésicules » élastiques, ou plutôt en des granules gélifiés sphériques ou ellipsoïdaux, formés de couches concentriques. Il est à peu près certain que ni la partie soluble dans l'eau ni la partie insoluble ne représentent des fractions homogènes qu'on ne peut du reste séparer quantitativement; néanmoins, on a pris l'habitude de parler d'*amylose* tout court pour désigner la partie soluble, et d'*amylopectine* pour la partie insoluble, quoique *Maquenne* et *Roux*²⁾, auxquels on doit le terme d'amylopectine, aient entendu autre chose par ces deux expressions: pour eux, amylose signifiait le principal constituant de l'amidon, la fraction saccharifiable, formant à peu près 80 % de l'amidon, et amylopectine désignait

¹⁾ K. H. Meyer und H. Mark, Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe. Leipzig 1930, p. 212.

²⁾ C. r. 140, 1303 (1905); Ann. chim. [8] 9, 179 (1906).

la substance accessoire non saccharifiée par l'extrait de malt, devant posséder dès lors une constitution différente de celle de l'amylose, et conférant d'ailleurs à l'amidon la faculté de donner de l'empois.

Le problème des différences de constitution que peuvent présenter l'amylose et l'amylopectine n'est pas encore résolu. L'hypothèse soutenue dans le temps notamment par *Samec*¹⁾, d'après laquelle l'amylopectine devait ses propriétés particulières à sa teneur en phosphore, doit être abandonnée depuis les travaux de *Posternak*²⁾: dans les amidons de céréales, ni l'amylose ni l'amylopectine ne contiennent du phosphore en liaison chimique. Mais à notre avis, une différence de constitution est rendue probable avant tout par la constatation importante, due à *Samec* et *Waldschmidt-Leitz*³⁾, d'après laquelle l'amylose est intégralement saccharifiée par la β -amylase, tandis que l'amylopectine donne naissance à un résidu non saccharifiable (« Grenzdextrin »). Généralement, on admet aujourd'hui que ces deux constituants de l'amidon ne se distinguent que par la grandeur de leurs molécules et qu'il existe une transition graduelle entre les molécules relativement petites de l'amylose et celles, très grandes, de l'amylopectine, constituées par des groupements hautement polymérisés mais réunis toujours selon le même mode. Récemment, *Badenhuizen*⁴⁾ a même été jusqu'à nier complètement la légitimité de cette subdivision: il estime que l'amidon est « homogène au point de vue chimique ».

Pour nos recherches, nous nous sommes adressés à l'amidon de maïs dont les hydrates de carbone sont exempts de phosphore et dont les grains présentent une grandeur moyenne homogène.

Pour commencer, nous en avons étudié le comportement vis-à-vis de divers dissolvants, en le comparant à l'hydrolysabilité par la β -amylase. Dans tous nos essais de fractionnement des constituants immédiats de l'amidon, nous avons écarté l'emploi de tout agent provoquant ou pouvant provoquer une dégradation chimique, tel que des acides ou des solutions salines concentrées de réaction acide, ou des bases en présence d'oxygène ou encore l'eau surchauffée.

Traitant un échantillon déterminé d'amidon de maïs (produit A) avec divers dissolvants (eau à 70° et à 80°, hydrate de chloral aqueux à 33 % à 20°), nous avons pu en extraire à peu près 20 % d'hydrates de carbone sous forme de solutions limpides, sans provoquer la destruction des grains; ceux-ci gonflent seulement sans subir d'autres altérations. Les solutions aqueuses limpides laissent déposer lentement un précipité floconneux d'amylose qui présente des interférences cristallines et qui résiste à l'action de la β -amylase; mais solubilisé

1) *M. Samec*, *Kolloidchemie der Stärke*, Leipzig 1927, p. 18.

2) *Th. Posternak*, *Helv.* **18**, 1351 (1935).

3) *Z. physiol. Ch.* **203**, 16 (1931).

4) *Rec. trav. bot. néerland.* **35**, 559 (1938); *Protopl.* **33**, 440 (1939).

par un procédé quelconque, ce précipité est entièrement saccharifié par ce ferment. En prolongeant l'action du dissolvant, on peut extraire encore 10 % d'autres fractions. Mais ces solutions sont troubles; elles déposent un précipité beaucoup plus lentement ou seulement après addition d'agents précipitants; la β -amylase ne les saccharifie plus intégralement, elles fournissent déjà de petites quantités de dextrines résiduelles donnant une coloration rouge avec l'iode. A côté de fractions d'amylose de poids moléculaire plus élevé, cet extrait aqueux contient donc déjà un peu d'amylopectine.

On peut aussi séparer les deux constituants de l'amidon selon *Samec*: de l'amidon de maïs (produit A) désagréé à 120° à l'eau a donné un empois trouble dont les particules en suspension se sont rapidement déposées à l'anode lors de l'électrodialyse, tandis que la solution limpide renfermait de l'amylose (environ 19% de l'amidon).

La teneur en amylose varie avec les échantillons; dans un autre (produit B), nous n'avons trouvé que 12—13 % d'amylose.

Ces essais montrent que l'amidon de maïs (produit A) contient environ 20 % d'un hydrate de carbone qui se différencie nettement du constituant principal de l'amidon retenu dans les grains gonflés; la subdivision classique en « amylose » (β -amylose d'après *A. Meyer*) et en « amylopectine » (α -amylose) est justifiée. Constatons ici par anticipation que ces deux constituants se distinguent par leur constitution: l'amylose du maïs est non-ramifié (cf. les mémoires suivants), l'amylopectine possède des ramifications; les différences entre les deux corps, notamment dans leur comportement vis-à-vis de la β -amylase, peuvent s'expliquer par ces différences de constitution. Reprenant les termes adoptés par *Maquenne* et *Roux*, nous proposerons donc d'appeler amylose, l'hydrate de carbone à molécules non-ramifiées, entièrement saccharifié par la β -amylase, et de réserver le nom d'amylopectine à l'hydrate de carbone à molécules ramifiées, dégradé par la β -amylase seulement jusqu'au stade de dextrine résiduelle. Grosso modo, cette subdivision basée sur la constitution est superposable à celle qui découle du comportement vis-à-vis de l'eau chaude ou à l'électrodialyse; les fractions d'amylose solubilisées à température plus élevée contiennent cependant déjà de l'hydrate de carbone ramifié, c'est-à-dire de l'amylopectine, et inversement l'amylopectine séparée au moyen de l'électro-dialyse peut aussi entraîner des fractions d'hydrocarbures non-ramifiés de poids moléculaire plus élevé, lorsque la cristallisation de l'amylose a déjà débuté. D'autre part, il est possible que de l'amylose retiré de la manière habituelle d'autres espèces d'amidon puisse contenir une proportion plus élevée d'hydrates de carbone ramifiés de poids moléculaire faible.

Connaissant encore insuffisamment les phénomènes enzymatiques, *Maquenne* et *Roux* ont admis que l'amidon contenait 80 % d'un hydrate de carbone intégralement saccharifiable en maltose, appelé amylose. Selon eux, la totalité du maltose résultant de l'action d'un

extrait de malt proviendrait de l'amylose, tandis que l'amylopectine se retrouverait quantitativement comme dextrine résiduelle. Mais cette hypothèse ne tient pas compte de l'éventualité d'une dégradation partielle de l'amylopectine; en réalité, au cours de l'hydrolyse par l'extrait de malt, 20—30 % seulement du maltose formé proviennent de l'amylose, et 70—80 % proviennent de l'amylopectine, quoique celle-ci ne soit dégradée qu'aux 70 %.

Le produit extractible à l'eau chaude, formé essentiellement d'amylose, est assez peu homogène; les premières fractions dissoutes ont une viscosité et un poids moléculaire plus faibles que les fractions plus difficilement solubles. Ceci résulte très clairement d'une expérience d'extraction de l'amidon par des portions successives d'eau chaude, les fractions dissoutes étant récupérées séparément par cristallisation. Le résultat de ces opérations est indiqué schématiquement dans la figure 2; le tableau 5 indique les viscosités des différentes fractions d'amylose. Les poids moléculaires de la dernière colonne ne concernent pas la grosseur des micelles en solution aqueuse, mais le poids moléculaire moyen des chaînes à valences principales; ils ont été obtenus par la mesure de la pression osmotique de solutions des fractions d'amylose acétylées (mémoire VI). Les fractions supérieures contiennent déjà certaines quantités de substances non entièrement saccharifiables (amylopectine). Un essai d'extraction fractionnée à l'hydrate de chloral de 33 %, dont il sera question dans le mémoire V, a donné un résultat analogue.

RÉSUMÉ.

L'amidon de maïs est composé de deux hydrates de carbone se distinguant par leur constitution chimique: l'amylose (10 à 20 %), un mélange d'homologues de polymérisation à chaînes non-ramifiées, d'un poids moléculaire de 10 000—60 000; et l'amylopectine (80 à 90 %), à molécules fortement ramifiées, de poids moléculaire compris entre 50 000 et 1 000 000.

Partie expérimentale.

De l'amidon de maïs de la *Corn Products Co.* a d'abord été débarrassé par lévigation d'une très petite quantité de petits grains: on suspend l'amidon dans de l'eau, on laisse la suspension se déposer et rejette la liqueur trouble surnageante. Après 4 à 5 répétitions de cette opération l'amidon sédimente avec formation d'une couche nettement délimitée; rendement 80—90%.

Des essais préliminaires ont montré que le gonflement de l'amidon est presque nul dans 50 parties d'eau de 60°; à 70°, le gonflement est marqué (diamètre des grains 2½ fois plus grand); à 80°, il l'est encore plus (diamètre triplé); à 90°, les grains éclatent et ne se laissent plus centrifuger. La quantité de substance passée en solution après une heure de traitement est de 16,5% à 80°, et de 7,7% à 70°. Dans ce dernier cas, les grains gonflés centrifugés obtenus à partir de 20 gr. d'amidon suspendus dans 1 litre d'eau ont occupé un volume de 250 cm³. (Dosage de l'amidon: 10 cm³ de solution sont additionnés de 40 cm³ HCl n.; après 30 minutes d'ébullition, on titre le glucose d'après *Willstätter et Schudel.*) Le volume de solution séparée des grains d'amidon par centrifugation a été mesuré; les chiffres indiqués plus haut se rapportent à ces volumes.

Epuisement à 80°.

20 gr. d'amidon de maïs (produit A) ont été agités lentement pendant 1 heure dans 1 litre d'eau à 80° (si l'agitation est rapide, les grains éclatent). L'empois est centrifugé. Les grains gonflés centrifugés sont de nouveau traités pendant 1 heure par un litre d'eau à 80°, etc. Ces manipulations ont été répétées en tout onze fois. Les solutions n'étaient pas absolument limpides (cf. tableau 1).

Tableau 1.
(Epuisement à 80°, produit A)

Durée totale d'ex- traction (heures)	Amidon dissous en gr. par opération	Amidon total extrait en %
1	3,2	16,0
2	1,16	21,8
3	1,59	29,8
4	0,7	33,2
5	0,28	34,6
6	0,08	35,0
7	0,02	35,1
8	0,02	35,2
9	0,03	35,4
10	—	35,4

Extraction à l'eau à 70°.

20 gr. d'amidon de maïs (produit A) sont traités par 1 litre d'eau à 70°, la partie insoluble est séparée par centrifugation de la solution et traitée de nouveau par 1 litre d'eau à 70° durant un temps déterminé. Les quantités de substance dissoutes ont été déterminées de temps en temps sur des prises. Pour extraire des quantités de substance comparables à celles extraites dans l'essai décrit précédemment, il fallait prolonger les opérations pendant plus de 15 jours (voir tableau 2, et fig. 1).

Tableau 2.
Extraction à l'eau à 70°.

Durée totale (heures)	Aspect de la solution	Teneur de la solu- tion en amidon en gr.	Amidon total extrait en %
8	limpide	1,84	9,2
16	„	2,20	11,0
centrifugation et changement d'eau		0,56	13,8
40	opalescente	2,25	22,2
67	„	2,58	23,9
134	„	2,90	25,5
211	„	3,06	26,3
centrifugation et changement d'eau		0,27	27,7
258	trouble	0,63	29,5
299	„	0,90	30,8
370	„	1,35	33,1

Extraction d'amidon de maïs naturel au moyen d'hydrate de chloral aqueux à 20°.

4 gr. d'amidon de maïs naturel ont été additionnés de 200 cm³ d'une solution aqueuse d'hydrate de chloral à 33% et agités lentement au thermostat à 20°. Après centrifugation, la solution claire surnageante a été décantée et sa teneur en amidon a été déterminée. Le culot dans le tube a été suspendu dans de la solution fraîche d'hydrate de chloral et porté de nouveau à 200 cm³. Cet empois a de nouveau été agité à 20°, centrifugé, etc. (voir tableau 3 et fig. 1).

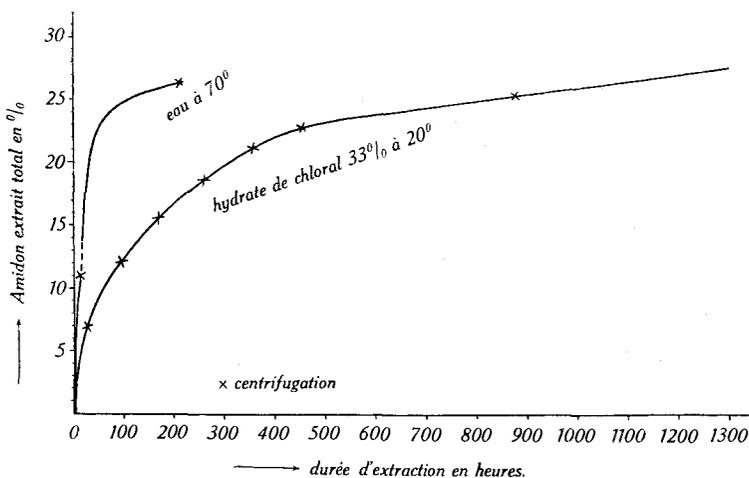


Fig. 1.

Extraction à l'eau et à l'hydrate de chloral.

Les solutions aqueuses d'hydrate de chloral sont toujours acides (p_H allant jusqu'à 4); les empois ont donc été additionnés de bicarbonate solide jusqu'à la neutralisation au bleu de bromothymol. Ces solutions conservent longtemps leur réaction neutre, même au contact de l'air. L'hydrate de chloral aussi bien que les trichloro-acétates sont difficiles à éliminer; comme leur présence entrave le dosage chimique du glucose, l'amidon de ces solutions a été dosé par polarimétrie.

En solution dans de l'hydrate de chloral de 33%, l'amidon possède un pouvoir rotatoire spécifique (rapporté à $C_6H_{12}O_6$) de $[\alpha]_D = 152^\circ$.

Tableau 3.

Extraction à l'hydrate de chloral à 20°.

Durée totale (heures)	Aspect de la solution	Teneur de la solution en amidon en gr.	Amidon total extrait en %
24	limpide	0,276	6,9
96	„	0,208	12,1
168	„	0,135	15,5
258	„	0,122	18,5
356	opalescente	0,101	21,1
451	„	0,064	22,7
875	„	0,099	25,1
1300	„	0,087	27,3

Désaggrégation à température plus élevée et séparation par électrodialyse.

De l'amidon suspendu dans 70 parties d'eau est porté pendant 1 heure à 100°; cette suspension a été soumise à l'électrodialyse. La solution s'éclaircit. La solution obtenue à partir du produit A contient 18% du produit de départ, la solution obtenue à partir du produit B 12%. A 120°, 19% du produit A passent en solution; la solution ne devient cependant pas tout à fait limpide au cours de l'électrodialyse.

Extraction fractionnée de l'amylose.

40 gr. d'amidon (produit A) ont été introduits dans 2 litres d'eau à 70° et traités un certain temps à cette température. Les grains gonflés ont été centrifugés, portés de nouveau à 2 litres par addition d'eau, chauffés et centrifugés. Après avoir maintenu un certain temps la température de 70°, on a porté successivement la solution à 80°, puis à 90°. A intervalles réguliers, on a prélevé des prises de 10 cm³ d'empois qui ont été centrifugés; dans les solutions séparées, on a dosé l'amidon. Jusqu'à 80°, les solutions ont été limpides; à 90°, après extraction de 26% de l'amidon primitif, les solutions ont été troubles. Les résultats de cet essai sont représentés dans le tableau 4 et la fig. 2.

La solution I donnait après repos un précipité I; II et III donnaient des précipités après concentration. IV a été précipité de la solution concentrée par l'alcool.

Tableau 4.

Durée totale (heures)	Temp. ^o	Aspect de la solution	Teneur de la solut. en amidon en gr.	Amidon total extrait	Désignation de la fraction
1	70	limpide	3,06	7,65	I
8	70		3,68	9,20	

9	70	limpide	0,36	10,1	
16	70		0,72	11,0	

20	70	limpide	0,18	11,5	II
21	80		1,08	13,7	
22	80		1,26	14,2	
23	80		1,44	14,6	

23½	80	limpide	0,74	16,4	III
27	80		1,98	19,5	
39	80		2,34	20,45	

40	80	opalescente	0,54	21,8	
44	80		0,72	22,25	
48	80		0,90	22,7	

49	80	opalescente	0,65	24,35	
57	80		0,90	25,0	

58	80	opalescente	0,36	25,9	IV
67	80		0,54	26,3	
68	90	trouble	2,34	30,8	
69	90		2,52	31,2	

*** centrifugation.

Les amyloses séparés ont été centrifugés, repris dans un peu d'eau froide, mis bien en suspension et de nouveau centrifugés. Ces opérations ont été répétées jusqu'à ce que la solution centrifugée ne donnât plus de réaction de coloration bleue avec l'iode, ou plus qu'extrêmement faible, état atteint généralement après 2 à 3 opérations. La dessiccation directe du produit humide donne des croûtes désagréables à manier ensuite. On évite cet inconvénient en suspendant le produit humide dans de l'alcool, en décantant l'alcool après un certain repos, et en répétant ce traitement 4 à 5 fois. Après avoir déplacé ainsi l'eau par de l'alcool, on déplace à son tour ce dernier par de l'éther toujours d'après le même procédé. En laissant finalement l'éther s'évaporer spontanément à l'air, et en imprimant pendant cette opération au tube un mouvement continu de rotation, on obtient une masse absolument pulvérulente.

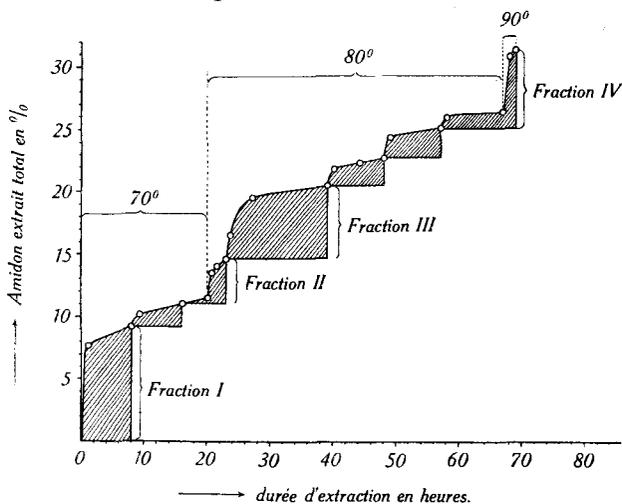


Fig. 2.

Extraction fractionnée à l'eau.

Les ordonnées des surfaces hachurées indiquent les teneurs des solutions rapportées à l'amidon total.

Les diverses fractions peuvent être caractérisées par leur viscosité dans divers dissolvants. L'hydrate d'hydrazine ou l'hydrate de chloral dans de l'eau se prêtent particulièrement comme dissolvants (cf. tableau 5). Les poids moléculaires ont été établis par comparaison avec d'autres produits dont les poids moléculaires avaient été déterminés par osmométrie de solutions de leurs acétates. Les viscosités ont été mesurées dans l'hydrate de chloral aqueux de 33%. La concentration de l'amylose était de 1 gr. dans 100 cm³; temp. 20°.

Tableau 5.

Fraction	$\frac{\eta_{\text{spéc.}}}{c}$	Saccharification par l'amylase	Dextrine résiduelle	Poids mol.
I	0,245	100%	0	ca. 40 000
II	0,335	100%	0	ca. 55 000
III	0,355	91%	9%	
IV	0,490			

Laboratoires de chimie inorganique et organique de l'Université de Genève.