

## 100. Fractionnement chromatographique de l'amidon.

### Recherches sur l'amidon 54<sup>1)</sup>

par Ed. H. Fischer et W. Settele.

(13 IV 53)

Les derniers travaux consacrés à l'inhomogénéité des fractions de l'amidon ont montré qu'en règle générale la principale difficulté rencontrée provenait de ce que les méthodes employées pour séparer les différentes fractions sont à l'heure actuelle beaucoup trop grossières. Elles utilisent toutes le traitement de solutions aqueuses par des alcools supérieurs selon *Schoch*<sup>2)</sup> pour séparer l'amylose (précipitée) de l'amylopectine (qui reste en solution), puis, sur les fractions ainsi obtenues, elles comportent des précipitations fractionnées par des solvants organiques ou encore des séparations par des méthodes physiques telles l'électrodécantation ou la centrifugation poussée<sup>3)</sup>.

Or la méthode de *Schoch*<sup>2)</sup>, excellente par ailleurs, n'est réellement valable que si les amidons ne possèdent que deux types de polysaccharides parfaitement distincts, le premier étant uniquement linéaire (amylose) et le second fortement ramifié (amylopectine). Dernièrement toutefois, plusieurs travaux ont mis en doute l'exactitude de cette supposition en montrant que certaines « amyloses » obtenues par le traitement de *Schoch* devaient contenir des polysaccharides possédant deux ou même plusieurs ramifications, ce qui indiquerait, soit que certains amidons étaient entièrement dépourvus d'amylose véritable, soit que celle-ci était contaminée par des amylopectines à très faible degré d'embranchement. Il devint alors indispensable de rechercher de nouvelles méthodes propres à effectuer un fractionnement rigoureux des polysaccharides de l'amidon et ce premier travail est consacré à la séparation chromatographique des fractions d'amidon sur colonne d'alumine.

#### *Historique.*

L'adsorption chromatographique des composants de l'amidon a déjà donné lieu à divers travaux<sup>4)</sup>. *Samec*<sup>5)</sup> remarque que l'amylose, contrairement à l'amylopectine, est très bien adsorbée par de l'ouate (cette adsorption est en réalité due aux acides gras contenus dans l'ouate). La chromatographie des glycogènes sur du carbonate de calcium a été faite par *Kowalski*<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Précédente communication: Helv. **36**, 702 (1953).

<sup>2)</sup> *T. J. Schoch*, Adv. in Carbohydrate Chem. **1**, 247 (1945).

<sup>3)</sup> *K. H. Meyer & W. Settele*, Helv. **36**, 197 (1953).

<sup>4)</sup> *O. Arndt*, Kolloid Beih. **7**, 212 (1915).

<sup>5)</sup> *M. Samec*, Kolloid Beih. **33**, 103 (1931).

<sup>6)</sup> *W. W. Kowalski*, Biochimia **13**, 131 (1948).

Dernièrement *Ulmann*<sup>1)</sup> a étudié l'application de l'oxyde d'aluminium à la séparation chromatographique de l'amidon. Il constate que contrairement à l'amylose, l'amylopectine est adsorbée sur une colonne acide. Il préconise une colonne dont le bas est rempli d'alumine alcaline et le haut d'alumine acide. En traitant ensuite l'amidon adsorbé à l'iode, cet auteur obtient plusieurs zones colorées indiquant la présence de différentes fractions qu'il n'a toutefois pas examinées. Pour éviter un effet de filtration, il secoue les solutions à chromatographier afin de détruire des agrégats éventuels<sup>2)</sup>. Récemment *Meyer & Feng*<sup>3)</sup> ont étudié la séparation sélective des fractions d'amidon sur papier.

### *Difficultés de la méthode.*

Le première difficulté que rencontre l'adsorption sélective, sur colonnes, des fractions de l'amidon, provient de ce que ces fractions ne diffèrent que par leur structure, ramifiée ou non. Elles ne possèdent aucun groupe spécialement actif, si l'on excepte l'acide phosphorique lié en très faible quantité (0,2 %) à certaines amylopectines. De plus, leur polydispersité est telle (PM 5000–300 000) qu'il est fort probable qu'il y a une plus grande ressemblance entre amyloses et amylopectines de même poids moléculaire qu'entre deux polysaccharides du même type, mais de poids moléculaire fortement différents.

On ne peut travailler à une concentration d'amidon supérieure à 0,5 %. En effet, dès qu'on augmente celle-ci, on provoque la formation d'agrégats qui superposent aux réactions d'adsorption des phénomènes de filtration des particules trop grosses, ce qui entraîne des pertes lors de la chromatographie. Ces pertes sont du reste difficiles à éviter puisque certaines fractions d'amyloses de poids moléculaire élevé rétrogradent même en solution diluée et qu'une fois fixées au haut de la colonne, ces fractions ne peuvent plus être éluées.

Par ailleurs, l'oxyde d'aluminium montre une affinité relativement faible pour l'amidon, ce qui nécessite l'emploi de colonnes importantes, même pour chromatographier de petites quantités d'amidon.

Enfin le choix d'un solvant et d'un éluant adéquats est limité par plusieurs facteurs. L'eau réagit généralement fortement avec les adsorbants (oxydes et silicates d'aluminium, Magnesol, etc.); la nature du tampon, celle de la solution, l'état de division de l'adsorbant et la présence éventuelle d'impuretés influencent considérablement la marche de l'opération<sup>4)</sup>. Les solvants organiques réagissent souvent avec l'amidon et empêchent presque toujours une analyse directe des fractions par l'iode.

### *Méthodes.*

*Produits de départ:* Nous avons étudié d'abord le fractionnement chromatographique de mélanges artificiels, en proportions très variées, d'amylose et d'amylopectine de tapioca, puis celui d'amidons totaux de tapioca, de maïs et de pomme de terre.

<sup>1)</sup> *M. Ulmann*, Kolloid-Z. **116**, 10 (1950); **123**, 105 (1951); Bioch. Z. **321**, 377 (1951); Naturwiss. **37**, 309 (1950).

<sup>2)</sup> *R. O. Herzog, O. Kratky & E. Petertil*, Trans. Faraday Soc. **29**, 60 (1933).

<sup>3)</sup> *K. H. Meyer & C. P. Feng*, Helv., à paraître.

<sup>4)</sup> *W. Koschara*, Z. physiol. Ch. **239**, 89 (1936).

a) Les amidons de tapioca et de maïs, dégraissés à l'acétone froide, sont fractionnés selon les méthodes de *Meyer & Rathgeb*<sup>1)</sup> et de *Schoch*<sup>2)</sup>. L'amylopectine obtenue est purifiée sur de l'acide stéarique selon *Meyer & Gibbons*<sup>3)</sup>. Des suspensions aqueuses à 0,5% de cette amylose et de cette amylopectine respectivement sont autoclavées 2 h. à 109°, puis traitées 10 min. au «mixing blender». On ajoute aux solutions 0,25% de soude et on les conserve à 4°. Pour réaliser les mélanges désirés, des quantités convenables de ces solutions ont été mélangées au moment de l'emploi.

b) Des suspensions aqueuses à 0,5% des amidons de tapioca, de maïs et de pomme de terre sont autoclavées et traitées comme sous a), mais employées comme des amidons totaux.

c) Au moment de l'emploi on agite fortement pendant 15 min. les solutions ci-dessus, on les neutralise avec la quantité calculée d'acide acétique dilué et on les dilue à l'eau dist. pour ramener la concentration en polysaccharides à 0,1%.

L'adsorption s'effectue sur de l'oxyde d'aluminium traité préalablement par des solutions différentes, selon le cas. Nos tubes chromatographiques, de 20–30 cm de longueur, sont de deux diamètres différents: 0,8 cm et 1,7 cm de diamètre. On en bouche un côté à la laine de verre dégraissée et on les remplit avec resp. 5 g et 25 g d'oxyde d'aluminium neutre<sup>4)</sup> en suspension, traité préalablement 1 h. soit par un excès d'acide chlorhydrique à 0,15% (resp. 40 cm<sup>3</sup> et 200 cm<sup>3</sup>), soit par un tampon molaire, soit par de l'eau dist., en portant ainsi l'adsorbant au pH désiré. La hauteur de la colonne d'adsorption est alors de 12 cm environ. Rapport H/D (hauteur sur diamètre de la colonne d'adsorption) 15 et 7 resp. Le rapport P/A (polysaccharides sur adsorbant, en poids) varie de  $4 \cdot 10^{-4}$  à  $20 \cdot 10^{-4}$ .

L'éluion s'effectue avec différents tampons molaires, suivant les cas: tampon lactate pH 2,7; tampon acétate pH 4,8, 5,0, 5,3, 5,6; tampon phosphate pH 7,0 (0,5-m.). La vitesse de passage (sans action mécanique telle trompe à eau, etc.) de la solution et de l'éluant dans la colonne varie de 1 à 2 h. par 20 cm<sup>3</sup>, volume d'une fraction d'éluion.

Analyse de l'éluat: on dose les polysaccharides récupérés par la méthode à l'anthrone et on détermine ensuite la proportion d'amylose et d'amylopectine à la méthode de «Blue-value» (BV).

a) Dosage colorimétrique de polysaccharides selon la méthode de *Morris*<sup>5)</sup> modifiée<sup>6)</sup>: On prépare à froid une solution «A» à 0,2% d'anthrone<sup>7)</sup> dans de l'acide sulfurique à 95%. Cette solution peut être conservée environ 3 semaines à 0° dans un flacon brun. 5 cm<sup>3</sup> de solution contenant de 10 à 450  $\gamma$  de sucre ou de polysaccharides sont additionnés de 10 cm<sup>3</sup> de «A». On plonge l'éprouvette dans de l'eau bouillante et agite la solution avec une baguette de verre à extrémité aplatie. Après 10 min. on plonge l'éprouvette dans un bain d'eau froide et courante. On détermine ensuite l'extinction au photocolorimètre avec filtre rouge, en comparaison avec un blanc sans hydrate de carbone traité dans les mêmes conditions. L'extinction obtenue est exprimée en glucose d'après une courbe étalon. La méthode est très sensible.

b) Connaissant la teneur en polysaccharides de l'éluat, on peut calculer le volume nécessaire pour déterminer la proportion d'amylose et d'amylopectine dans le mélange, selon la méthode de *McCready & Hassid*<sup>8)</sup>, légèrement modifiée comme suit: on ajoute 0,5 cm<sup>3</sup> d'une solution contenant 0,1% I<sub>2</sub> et 1% KI à 24,5 cm<sup>3</sup> d'une solution contenant 0,5 mg de polysaccharides. On détermine ensuite l'extinction de la coloration au photocolorimètre avec filtre rouge, en comparaison avec un blanc sans amidon. L'extinction

<sup>1)</sup> K. H. Meyer & P. Rathgeb, *Helv.* **31**, 1533 (1948).

<sup>2)</sup> T. J. Schoch, *Adv. in Carbohydrate Chem.* **1**, 247 (1945).

<sup>3)</sup> K. H. Meyer & G. C. Gibbons, *Helv.* **33**, 210, 213 (1950).

<sup>4)</sup> De la Maison *Woelm*, Eschwege (Allemagne).

<sup>5)</sup> D. L. Morris, *Sci.* **107**, 254 (1948).

<sup>6)</sup> Ed. H. Fischer & Laure Kohlès, *Helv.* **34**, 1129 (1951).

<sup>7)</sup> R. Dreywood, *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* **18**, 499 (1946).

<sup>8)</sup> R. M. McCready & W. Z. Hassid, *Am. Soc.* **65**, 1154 (1943).

obtenue est exprimée en % amylose-amylopectine d'après une courbe de référence. Celle-ci varie avec chaque type d'amidon. Sensibilité de la méthode:  $\pm 1\%$  amylose-amylopectine.

Notons que lors de la chromatographie, on obtient des fractions d'amylopectine pure qui donnent un BV nettement inférieur à la valeur fournie par la courbe de référence, ce qui montre bien l'inhomogénéité de l'amylopectine préparée selon Schoch.

*Révélation:* A la fin de chaque opération, les colonnes éluées ont encore été traitées par une solution  $n/400$  d'iode, comme contrôle, ce qui révèle les fractions non éluées. Cette méthode rapide ne donne pas des indications très exactes, car la coloration n'est pas une fonction linéaire de la quantité en polysaccharides, et ni son intensité ni sa nuance ne sont identiques pour l'amylose et l'amylopectine. De plus ces différentes couleurs ne se distinguent pas toujours dans la colonne par des zones ou limites bien nettes.

### Les résultats.

1. *Des essais effectués dans les conditions d'Ulmann<sup>1</sup>* (colonne pH 3,5 ou pH 7,0, H/D = 15, P/A =  $20 \cdot 10^{-4}$ ) avec des mélanges d'amylose et d'amylopectine de tapioca en proportions variant de 10 à 10% ont montré que la quantité d'adsorbant prescrite est insuffisante pour la colonne acide puisqu'une partie de l'amidon n'est pas retenue. Par la révélation à l'iode, on n'obtient qu'une faible différence entre les mélanges amylose/amylopectine 1:9 et 9:1 pour les deux pH de l'alumine. Tout ce qu'on peut dire, c'est que l'affinité de l'adsorbant neutre pour l'amidon est la plus forte.

2. *Influence du pH de la colonne et de l'éluant.* Augmentant la quantité d'adsorbant et travaillant dans les conditions suivantes: P/A =  $4 \cdot 10^{-4}$ , H/D = 7, colonne pH 3,5, 5,0 et 7,0, chromatographie des mélanges d'amylose et d'amylopectine de tapioca, élution par des tampons à pH 4,8–7,0 et par de l'acide chlorhydrique à 0,15%, nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau 1 (voir aussi fig. 1).

**Tableau 1.**

Chromatographie de mélanges artificiels d'amylose et d'amylopectine de tapioca.  
Colonne et éluant à différents pH.

Traitement de la colonne	Elution par tampon molaire	Fractions à 20 cm <sup>3</sup>	Résultat	Fig.
HCl à 0,15% et tampon pH 2,7	HCl à 0,15%	4	séparation très incomplète	
	tampon pH 7,0	5		
tampon pH 5,0	tampon pH 4,8	3	séparation bonne	
	tampon pH 4,8	11		1a
H <sub>2</sub> O dist.	tampon pH 5,3	8		1b
	tampon pH 5,6	9	séparation très incomplète	1c
	tampon pH 5,6 0,02-m.	20	aucune élution	
	tampon pH 7,0	20		

<sup>1</sup>) M. Ulmann, Kolloid. Z. **116**, 10 (1950); **123**, 105 (1951); Bioch. Z. **321**, 377 (1951); Naturwiss. **37**, 309 (1950).

La meilleure séparation est réalisée par adsorption sur colonne neutre et élution à pH 4,8 ou 5,3 (tampon à concentration molaire). L'amylose est éluee plutôt par un tampon acide, tandis que l'amylopectine est mieux entraînée par un tampon de pH plus élevé, mais l'élution est alors fortement retardée (fig. 1c). On est limité d'ailleurs dans le choix d'un tampon alcalin par le fait qu'au-dessus du pH 8, le passage de l'éluant devient trop lent. Notons encore qu'un tampon à faible molarité, p. ex. 0,02-m. au lieu de 1-m., n'est pratiquement plus capable d'éluer l'amidon.

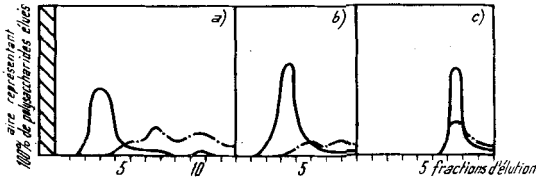


Fig. 1.

Chromatogrammes du mélange 60% amylose/40% amylopectine de tapioca. Colonne neutre, élution à différents pH: a) pH 4,8 b) pH 5,3 c) pH 5,6  
 — amylose. - - - amylopectine.

Malgré toutes les précautions prises, il y a pendant la chromatographie une rétrogradation considérable et constante de 15–20% de l'amylose. Par élution prolongée, on ne peut récupérer totalement que l'amylopectine.

3. Les conditions favorables établies (colonne neutre,  $H/D = 7$ , élution à pH 4,8 et ensuite à pH 7,0) ont été appliquées à la chromatographie de l'amidon de maïs naturel, contenant 17% d'amylose. Le tableau 2 montre les résultats obtenus par la variation du rapport P/A.

Tableau 2.

Chromatographie de l'amidon de maïs sur colonne neutre.  
 Variation du rapport P/A.

P/A	1 <sup>e</sup> élution par	Frac-tions 20 cm <sup>3</sup>	2 <sup>me</sup> élution par	Frac-tions 20 cm <sup>3</sup>	Résultat	Fig.
$4 \cdot 10^{-4}$	tampon pH 4,8	10			séparation bonne	
$4 \cdot 10^{-4}$	tampon pH 4,8	10	HCl à 0,15%	10	2 <sup>me</sup> élution inefficace	2a
$4 \cdot 10^{-4}$	tampon pH 5,3	11			séparation bonne	
$8 \cdot 10^{-4}$	tampon pH 4,8	8	tampon pH 7,0	12	séparation bonne	2b
$16 \cdot 10^{-4}$	tampon pH 4,8	6			aucune séparation	2c

Les chromatogrammes à rapport P/A de  $4 \cdot 10^{-4}$  à  $8 \cdot 10^{-4}$  mettent en évidence une bonne séparation sélective. La fig. 2 montre nettement que l'amylopectine de maïs est éluee plutôt par un tampon neutre, comme c'était le cas pour l'amidon de tapioca. La séparation

devient de moins en moins marquée au fur et à mesure qu'on augmente le rapport P/A.

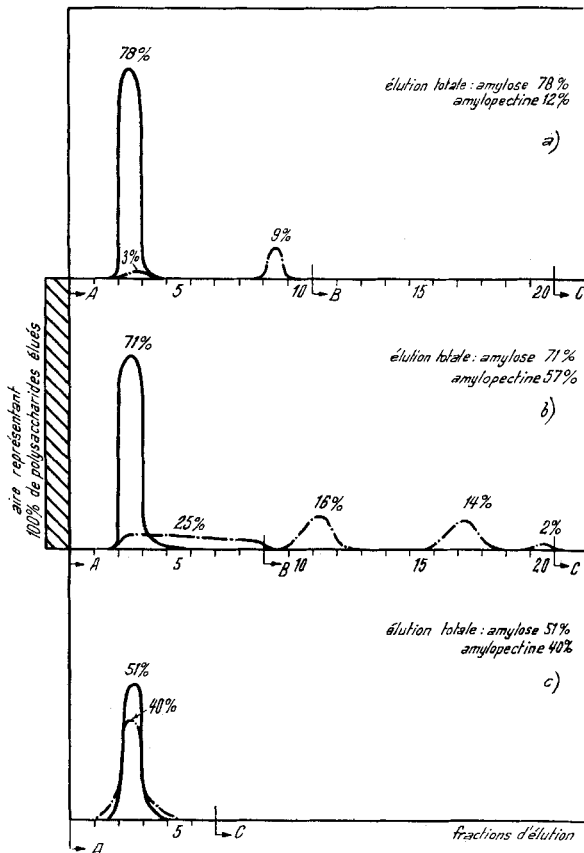


Fig. 2.

Chromatogrammes de l'amidon de maïs. Variation du rapport P/A: a)  $P/A = 4 \cdot 10^{-4}$

b)  $P/A = 8 \cdot 10^{-4}$  c)  $P/A = 16 \cdot 10^{-4}$

→ A élution à pH 4,8. → B élution à pH 7,0. → C révélation à l'iode.

— amylose. - - - amylopectine.

On remarque ensuite une séparation de l'amylopectine. Après 20 fractions d'élution à  $20 \text{ cm}^3$  on trouve 6 sous-fractions bien distinctes, 4 dans les éluats et 2 restées dans la colonne (révélation à l'iode). Les trop faibles quantités des sous-fractions éluées (0,4–1,0 mg) ne nous ont pas encore permis la détermination de leurs caractéristiques (poids moléculaire, degré de ramification, dégradation amylatique, etc.).

Cette inhomogénéité de l'amylopectine a d'ailleurs été trouvée récemment au moyen d'autres méthodes par Meyer & Settele<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>) K. H. Meyer & W. Settele, Helv. **36**, 197 (1953).

4. Pour confirmer ce fractionnement de l'amylopectine, nous avons soumis à la *séparation chromatographique l'amylopectine «pure» de maïs* (préparée selon Schoch), dans les conditions les plus favorables, établies ci-dessus. Cette opération nous a fourni trois sous-fractions assez semblables à celles obtenues par la chromatographie de l'amidon entier, mais tout de même non identiques, ce qui permet de conclure qu'il y a pendant l'opération une interaction entre les deux composants de l'amidon.

Un fait très remarquable est que la troisième fraction d'éluion contient 9% amylose à côté de 91% amylopectine, ce qui prouve que l'amylopectine préparée selon Schoch et purifiée sur de l'acide stéarique, n'est pas exempte d'amylose (environ 1% d'amylose) et que par chromatographie sur alumine, on peut déceler et séparer même de petites quantités d'amylose contenues dans une amylopectine.

5. La *chromatographie des amidons de pomme de terre et de tapioca*, contenant 20% de l'amylose, a été effectuée dans les conditions suivantes: colonne neutre;  $P/A = 4 \cdot 10^{-4}$ ; 1<sup>e</sup> éluion à pH 4,8 (6 fractions), 2<sup>me</sup> éluion à pH 7,0 (10 fractions);  $H/D = 7$ .

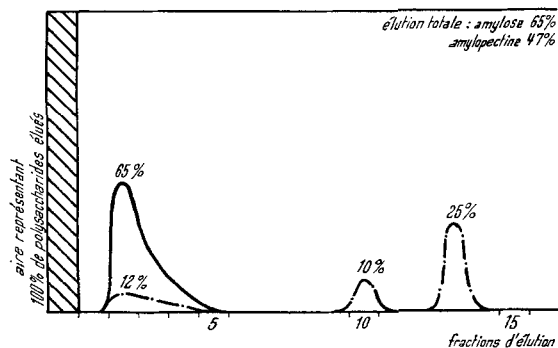


Fig. 3.

Chromatogramme de l'amidon de pomme de terre.  
—— amylose. — — — amylopectine.

Les chromatogrammes de l'amidon de pomme de terre ressemblent au début à ceux de l'amidon de maïs. La séparation est bonne et on trouve de nouveau plusieurs sous-fractions de l'amylopectine, soit trois qui sortent de la colonne et une quatrième qui ne migre pas même après éluion épuisante.

Les chromatogrammes de l'amidon de tapioca au contraire sont plus complexes. Pour la première fois, nous révélons par fractionnement chromatographique une inhomogénéité de l'amylose, puisqu'on élue deux sous-fractions, dont la dernière accompagne les deuxième et troisième des quatre sous-fractions de l'amylopectine observées ici.

Cette observation semble confirmer pour l'amidon de tapioca les résultats de *Kerr & Cleveland*<sup>1)</sup> qui, par des dégradations  $\beta$ -amylatiques et amylo-glucosidasiques des « amyloses » de tapioca et de pomme de terre, concluent à l'existence « d'amyloses » à une ou deux ramifications.

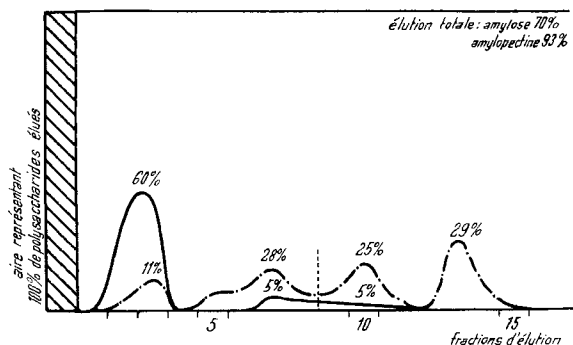


Fig. 4.  
Chromatogramme de l'amidon de tapioca.  
—— amylose.    - - - - amylopectine.

La chromatographie des amidons de pomme de terre et de maïs par contre ne nous a fourni qu'une seule fraction d'amylose, ce qui concorde plutôt avec l'hypothèse de *Meyer & coll.*<sup>2)</sup>, selon laquelle les amyloses de pomme de terre et de maïs sont uniquement linéaires. L'amidon de maïs en particulier donne par chromatographie une seule fraction d'amylose très serrée.

#### SUMMARY.

1. Synthetically prepared mixtures of tapioca amylose and amylopectin, as well as natural starches of maize, potatoe and tapioca were studied by means of chromatographic fractionation on alumina columns in aqueous medium.

2. The affinity of neutral alumina for the constituents of starch is stronger than that of acid alumina. It remains relatively weak in either case.

3. Amylose is best eluated by an acid buffer and gives a single, sharp fraction. With amylopectin, the best results are obtained with a neutral buffer, which affords several fractions.

4. The eluated fractions are analyzed by colorimetric determination of the polysaccharide content and of the proportion of amylose and amylopectin.

5. Colour development by iodine gives approximate indications which are only of value as control.

<sup>1)</sup> *R. W. Kerr & F. C. Cleveland*, *Am. Soc.* **74**, 4036 (1952).

<sup>2)</sup> *K. H. Meyer, P. Bernfeld & W. Wertheim*, *Helv.* **24**, 378 (1941).



6. Favorable conditions for a selective separation of the two constituents of starch are determined.

7. The amylopectins have been separated into several subfractions. The amyloses on the other hand have yielded only one fraction, except in the case of tapioca amylose, where two subfractions are obtained.

Laboratoire de chimie organique de l'Université  
de Genève.

## 101. Synthese und analgetische Wirkung einiger 4-Phenyl-piperidin-(4)-alkylsulfone.

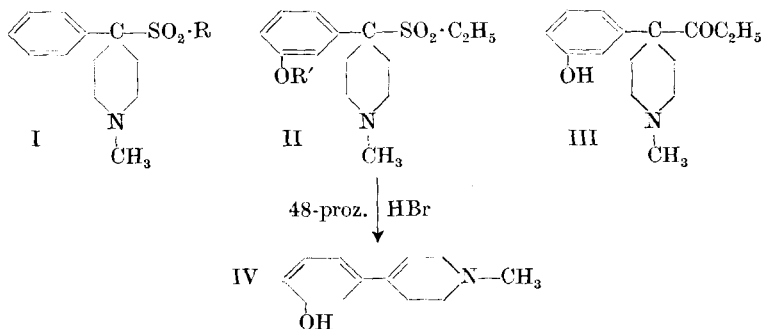
2. Mitteilung

von J. Büchi, M. Prost, E. Eichenberger und R. Lieberherr †.

(18. IV. 53.)

### A. Einleitung.

In unserer 1. Mitteilung<sup>1)</sup> beschrieben wir die Synthese und analgetische Wirkung Dolantin-ähnlicher Sulfone I. Die Darstellung entsprechender Cliradon-artiger Verbindungen II sollte uns den Einfluss der *m*-Oxygruppe im Phenylring auf die pharmakologische Wirkung in der Reihe dieser Sulfone zeigen. Denn für Cliradon (III) war durch die Einführung der *m*-ständigen Hydroxylgruppe eine Wirkungssteigerung gegenüber den Bemidonen erzielt worden<sup>2)3)4)</sup>. Ausserdem war der Einfluss der *N*-Substitution auf die analgetische Wirkung zu überprüfen.



<sup>1)</sup> M. Prost, Diss. ETH. Zürich 1952; Büchi, Prost, Eichenberger & Lieberherr, Helv. **35**, 1527 (1952).

<sup>2)</sup> Kägi & Miescher, Helv. **32**, 2489 (1949).

<sup>3)</sup> Avison & Morrison, Soc. **1950**, 1469.

<sup>4)</sup> BIOS, No. **116**, 51, 55, 57, 65.