

DOSAGE A L'AIDE DE L'ACIDE PERIODIQUE D'UN MÉLANGE DE COLAMINE ET DE SÉRINE

par

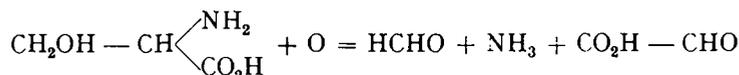
PAUL FLEURY, JEAN COURTOIS ET MARCEL GRANDCHAMP

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie, Paris (France)

Les travaux récents ont montré que la constitution des phosphoaminolipides pouvait être plus complexe qu'on ne le pensait généralement.

C'est ainsi que les phospholipides du cerveau fournissent par saponification, à côté des acides glycérophosphoriques, des acides inositolphosphoriques. D'un autre côté, les bases aminées peuvent renfermer de la sérine en plus de la choline et de la colamine. Une détermination de la colamine et de la sérine dans leurs mélanges présente donc un intérêt biologique actuel. Cette détermination a déjà été faite par BURMASTER¹ en oxydant la colamine et la sérine par l'acide periodique, en dosant l'ammoniac libéré et en titrant d'autre part la sérine indépendamment selon VAN SLYKE².

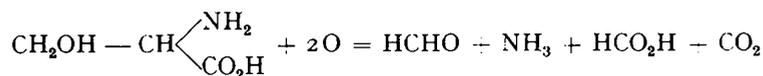
Au cours d'un travail portant sur le comportement de l'acide periodique sur une série de composés hydroxylaminés³, travail qui nous a permis de montrer les limites de la réaction, nous avons établi un procédé basé uniquement sur l'emploi de l'acide periodique. Nous avons constaté en effet que l'oxydation de la colamine par l'acide periodique est plus compliquée que la réaction indiquée autrefois par FLEURY ET GUITARD⁴: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{O} = \text{NH}_3 + 2\text{HCHO}$. En réalité, une molécule de colamine réduit 1,08 molécules d'acide periodique. Ce rapport paraît indépendant des proportions respectives d'amine et d'oxydant. D'autre part, nous avons montré que la sérine est attaquée en deux étapes. La première très rapide fut mise en évidence par NICOLET ET SHINN⁵; une molécule de sérine est oxydée et désaminée en formaldéhyde, ammoniac et acide glyoxylique.



Différents auteurs ont basé sur cette première étape de la réaction des méthodes de détermination de la sérine en dosant soit le formaldéhyde libéré, soit l'ammoniac formée. Mais FLEURY ET BON-BERNATETS⁶ ont montré antérieurement que l'acide glyoxylique est lui-même oxydé, mais lentement par l'acide periodique, selon la réaction:



Il était donc à prévoir qu'après contact prolongé avec l'acide periodique la sérine serait oxydée selon le schéma:



Nous avons pu en vérifier l'exactitude à p_H 3.0 et 15° . L'étude de l'oxydation en fonction du temps (Fig. 1), indique qu'il se forme rapidement dans un premier temps, deux fonctions aldéhydiques avec réduction d'une molécule d'acide periodique. Par la suite, l'une des molécules d'aldéhyde disparaît, tandis qu'une seconde molécule d'acide periodique est réduite. Ces faits sont conformes à ceux observés au cours de l'oxydation de l'acide glyoxylique. Par ailleurs, au bout de 48 heures, une molécule de sérine oxydée a dégagé 0.95 molécules d'anhydride carbonique (théorie 1.0). Nous avons pensé tout d'abord qu'il serait possible de déterminer la sérine en présence de colamine par dosage de l'anhydride carbonique dégagé. Mais nous avons dû renoncer à ce moyen en constatant que la colamine traitée par l'acide periodique libère toujours du gaz carbonique dont la quantité, bien que faible, n'est pas négligeable.

Nous avons tenté ensuite d'utiliser l'observation suivante relative à l'influence de la réaction du milieu sur la vitesse de l'oxydation par l'acide periodique. Nous avons constaté en effet que la colamine commence à être oxydée d'une façon appréciable à partir de p_H 3.2 tandis que la sérine ne paraît l'être qu'au-dessus de p_H 4.5.

Nous avons alors recherché si, en opérant à p_H 4.0, la colamine serait seule oxydée. Nos essais nous ont montré que pour oxyder totalement la colamine à p_H 4.0, il était nécessaire de prolonger la durée de la réaction d'une façon telle que la sérine subissait un début d'attaque.

Nous avons finalement mis au point une technique basée sur le fait qu'après une oxydation periodique de 48 heures une molécule d'éthanolamine réduit 1.08 molécules d'acide periodique en donnant naissance à une molécule d'ammoniaque.

Dans les mêmes conditions une molécule de sérine donne également naissance à une molécule d'ammoniaque, mais réduit *deux* molécules d'acide periodique.

Ces deux déterminations expérimentales: acide periodique consommé et ammoniaque formée, permettent de calculer les proportions relatives de colamine et de sérine.

MODE OPÉRATOIRE

La prise d'essai doit contenir 25 mg au plus, s'il s'agit de colamine, et 40 mg, s'il s'agit de sérine. Pour les mélanges la teneur maximum sera intermédiaire et variera selon les proportions relatives de ces deux composés.

Deux prises d'essai (5 ml par exemple) sont introduites, l'une dans une fiole jaugée de 100 ml, l'autre dans un erlenmeyer de même contenance — un second erlenmeyer, destiné à contenir l'essai-témoin, reçoit 5 ml d'eau distillée. Dans chacun des trois récipients, nous ajoutons successivement:

Bibliographie p. 340.

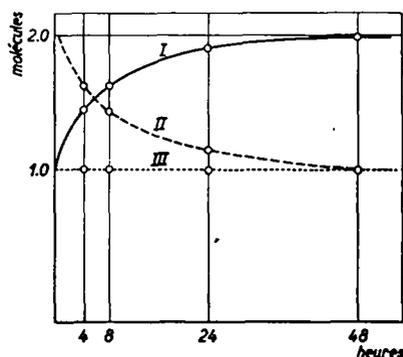


Fig. 1. Evolution de l'oxydation de la sérine par l'acide periodique en fonction du temps

Courbe I: Molécules d'acide periodique réduites par une molécule de sérine

Courbe II: Molécules d'aldéhydes libérés par une molécule de sérine

Courbe III: Molécules d'ammoniac formé par une molécule de sérine

Température: 15°

10 ml de solution environ N/10 de periodate de sodium*,
 5 ml de solution saturée de bicarbonate de potasse,
 20 ml environ d'eau distillée.

Après 48 heures de réaction à la température du laboratoire, nous ajoutons dans les 3 flacons:

15 ml de solution N/10 d'anhydride arsénieux bicarbonaté,

2 ml de solution à 20% d'iodure de potassium, puis nous laissons en contact 15 minutes.

Nous déterminons d'une part l'acide periodique réduit, de l'autre, l'ammoniac formé.

1. Détermination de l'acide periodique réduit

L'excès d'anhydride arsénieux est titré dans les deux erlenmeyers au moyen d'une solution d'iode 0.1 N sans empois d'amidon.

Soit n_1 ml versés dans l'essai témoin, et n_2 ml versés dans le mélange réactionnel; ces 5 ml du mélange ont donc réduit $n_1 - n_2$ ml d'acide periodique 0.1 N (0.05 M).

6. Détermination de l'ammoniac libéré

Le volume du liquide, dans la fiole jaugée, est complété à 100 ml. L'ammoniac est titré sur 20 ml du mélange dans l'appareil de PREGL, au moyen d'une solution d'acide sulfurique 0.02 N en présence du mélange rouge de méthyle — bleu de méthylène. Soit n_3 ml utilisés, 100 ml de la dilution, soit 5 ml de la prise d'essai primitive, correspondent à 5 n_3 ml d'acide 0.02 N.

CALCUL DES RÉSULTATS

Désignons par x le nombre de ml de colamine 0.1 M contenue dans la prise d'essai, et par y le nombre de ml de solution de sérine 0.1 M. Nous pouvons écrire:

$$1.08 x + 2 y = \frac{n_1 - n_2}{2}$$

$$x + y = n_3$$

d'où l'on tire:

$$x = \frac{2 n_3 - \frac{(n_1 - n_2)}{2}}{0.92}$$

$$y = n_3 - \left[\frac{2 n_3 - \frac{(n_1 - n_2)}{2}}{0.92} \right]$$

Or, 1 ml de chacune des solutions 0.1 M contient respectivement:

6.10 mg de colamine

10.51 mg de sérine

* Solution de periodate 0.1 N:

paraperiodate de sodium $\text{IO}^3\text{Na}^3\text{H}^3$	15 g
solution d'acide sulfurique N	150 ml
eau distillée pour compléter à	1000 ml

La prise d'essai est donc constituée de :

6.1 x mg de colamine

10.51 y mg de sérine.

RÉSULTATS

L'analyse de divers mélanges de sérine et de colamine a donné les résultats suivants :

TABLEAU I

Le volume des échantillons est de 50 ml

Colamine (mg)		Erreur %	Sérine (mg)		Erreur %
introduite	trouvée		introduite	trouvée	
36.6	37.7	+ 2.5	31.6	30.1	- 4.5
18.3	17.6	- 3.5	31.6	32.2	+ 1.5
0.0	0.0		52.6	53.6	+ 3.7
18.3	19.0	+ 3.7	63.0	62.6	- 0.6
12.1	11.6	- 4.0	31.6	33.2	+ 5.0
24.4	25.3	+ 3.5	63.0	61.6	- 2.0

Remarques: 1. Il peut être préférable d'utiliser, au lieu de la quantité d'acide periodique réduit, les quantités d'aldéhydes libérés: les valeurs étant égales, le calcul n'est pas modifié. L'analyse peut alors être effectuée sur des prises d'essai très réduites, la détermination des aldéhydes, comme celle de l'ammoniac, se prêtant à d'excellents micro-dosages bien connus — la spécificité de la méthode serait alors augmentée.

2. Comme il est possible de doser par alcalimétrie seulement la colamine, en présence du mélange rouge de méthyle — bleu de méthylène, dans le mélange sérine-colamine en solutions pures, il suffit de déterminer l'acide periodique réduit global pour obtenir par différence la quantité de sérine contenue dans le mélange. Mais il est évident que cette technique présente moins de spécificité que les deux autres.

3. Il est possible de concevoir une autre variante de la technique, basée sur la détermination de l'acide formique libéré par la sérine après 48 heures d'oxydation periodique, la colamine étant dosée par différence, ou, éventuellement par alcalimétrie.

4. Si le mélange contient des glycols (glycérol, inositol) provenant de l'hydrolyse des phospholipides, il doit être possible, comme des expériences d'orientation semblent le montrer, de doser ces glycols par oxydation periodique, en milieu plus acide que p_H 1.0 (nous avons vu que dans un tel milieu ni la sérine ni la colamine ne sont attaquées). Nous nous sommes bornés simplement à l'étude du mélange des deux amines, qui, d'ailleurs, semblent pouvoir être séparées de l'hydrolysate par des réactifs précipitants sélectifs.

Nous rappelons que la choline, qui peut également accompagner la sérine et la colamine dans les préparations de céphalides, n'est pas oxydable par l'acide periodique⁴.

RÉSUMÉ

Nous proposons une méthode indirecte du dosage de la colamine et de la sérine dans leur mélange, basée sur la détermination de l'ammoniac dégagé et de l'acide periodique réduit après contact prolongé. Cette méthode permet de doser jusqu'à 25 mg de colamine et 40 mg de sérine. Sa précision est de $\pm 5\%$. Elle paraît devoir être applicable aux milieux biologiques.

Bibliographie p. 340.

SUMMARY

An indirect method of estimating colamine and serine in their mixtures is proposed, based on the determination of the ammonia set free and of the periodic acid reduced after prolonged contact. This method allows the estimation of up to 25 mg of colamine and up to 40 mg of serine. This accuracy is $\pm 5\%$. It appears to be applicable to biological media.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir beschreiben eine indirekte Bestimmungsmethode von Colamin und Serin in ihren Gemischen; diese gründet sich auf die Bestimmung des abgeschiedenen Ammoniaks und der reduzierten Perjodsäure nach längerer Einwirkung. Es können bis zu 25 mg Colamin und 40 mg Serin bestimmt werden. Die Genauigkeit beträgt $\pm 5\%$. Die Methode scheint auch auf biologische Medien anwendbar zu sein.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. F. BURMASTER, *J. Biol. Chem.*, 1 (1946) 165.
- ² D. VAN SLYKE ET R. T. DILLON, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 22 (1939) 480.
- ³ P. FLEURY, J. COURTOIS ET M. GRANDCHAMP, *Bull. soc. chim. France*, (sous presse).
- ⁴ P. FLEURY ET H. GUITARD, *Bull. soc. chim. biol.*, 28 (1946) 651.
- ⁵ B. NICOLET ET L. SHINN, *J. Am. Chem. Soc.*, 61 (1939) 1615.
- ⁶ P. FLEURY ET G. BON-BERNATETS, *J. pharm. chim.*, 23 (1936) 85.

Reçu le 28 octobre 1948