

L'ANALYSE SIMULTANÉE DES HEXOSES, DES TRIOSES ET DE LEURS ESTERS PHOSPHORÉS

par

H. G. HERS*, H. BEAUFAYS ET C. DE DUVE

Laboratoire de Chimie Physiologique, Université de Louvain (Belgique)

Les nécessités de divers travaux entrepris dans ce laboratoire nous ont amenés à réexaminer certaines des techniques utilisées pour l'analyse de mélanges complexes contenant des hexoses, des trioses et leurs esters phosphorés. Les données de la littérature à ce sujet sont assez fragmentaires et ne sont pas toujours concordantes. Aussi avons nous cru utile de réunir dans une note les résultats de nos recherches. Nous ajoutons quelques renseignements concernant la préparation des composés en question.

Nos investigations ont porté sur les dérivés suivants: glucose (G), glucose-1-phosphate (G1P), glucose-6-phosphate (G6P), fructose (F), fructose-1-phosphate (F1P), fructose-6-phosphate (F6P), fructose-1-6-diphosphate (FDP), trioses (T) = D-glycér-aldéhyde (GA) et dioxyacétone, trioses-phosphates (TP).

SUBSTRATS

Nous avons utilisé des préparations commerciales de D-glucose et de D-fructose HOFFMAN-LAROCHE, de DL-glycéraldéhyde et de dioxyacétone PARAGON. Pour les autres composés, nous utilisons les techniques suivantes:

Glucose-1-phosphate

Cet ester est préparé par voie enzymatique selon une technique dérivée de celles de HANES¹, SUMNER ET SOMERS² et MACCREADY ET HASSID³. Au milieu d'incubation, composé de jus de pomme de terre, de fécule et de phosphate inorganique, dans les proportions recommandées par HANES¹, nous ajoutons du NaCN 0.001 M, qui inhibe les fermentations parasites². Une fois l'équilibre de la réaction phosphorylasique établi, nous suivons les indications de HANES¹, en général jusqu'au stade de la première cristallisation dans l'acétone. Les cristaux sont redissous dans un petit volume d'eau et passés sur une double colonne de résine dans un système analogue à celui de MACCREADY ET HASSID³. La colonne supérieure contient une résine sulfonique (Amberlite IR 120), qui retient les cations. L'effluent acide qui en sort est recueilli directement sur une colonne contenant une résine basique (Amberlite IR 4 B), qui fixe le G1P. Les impuretés phénoliques et les dextrines traversent les deux colonnes ou sont retenues par adsorption au sommet de la première. On déconnecte la colonne inférieure et on élue le G1P à l'aide de KOH 0.5 N. Les fractions contenant l'ester sont ramenées à pH 8 par l'acide acétique et additionnées de 1.2 volumes de méthanol. Le lendemain, on sépare les cristaux de

* Chercheur qualifié du FNRS.

K_2 -glucose-1-phosphate $\cdot 2H_2O$ et on recristallise dans l'acétone, d'après les indications de HANES¹. Le produit obtenu ne contient pas de P inorganique et est entièrement dépourvu de pouvoir réducteur. Les valeurs de P total, P acido-labile et glucose acido-labile indiquent une pureté supérieure à 99%.

D'après MACCREADY ET HASSID³ la purification par les résines peut se faire d'emblée sur le milieu d'incubation, après élimination du phosphate inorganique par la mixture magnésienne. Nous n'avons jamais suivi ce mode opératoire, qui, d'après les auteurs, fournit un produit d'une très haute pureté.

Glucose-6-phosphate

COLOWICK ET SUTHERLAND⁴ ont montré que cet ester peut aisément être préparé aux dépens du précédent par l'action de la phosphoglucomutase, dont l'équilibre est fortement en faveur du G6P (94%). Nous utilisons à cette fin l'enzyme cristallisé selon NAJJAR⁵, après nous être assuré qu'il est libre de toute trace de phosphohexoisomérase; l'incubation se fait à pH 7.5 en présence de GiP à concentration initiale 0.1 M, de tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) 0.08 M, de $MgCl_2$ 0.0015 M et de 8-hydroxyquinoléine 0.003 M servant d'activateur (SUTHERLAND⁶). Sitôt l'équilibre atteint, on ajoute HBr concentré jusqu'à concentration normale et on chauffe à 100° pour hydrolyser le GiP restant. On neutralise jusqu'à pH 8 à l'aide de $BaCO_3$ solide, puis d'une solution de $Ba(OH)_2$. Après élimination du précipité de phosphate de baryum et de protéines, le G6P de baryum est insolubilisé par addition de 1.2 volumes d'alcool, recueilli par filtration, lavé et séché à l'alcool et à l'éther. L'ester se dissout facilement dans l'eau si on acidifie le milieu au moyen d'une quantité minime de résine acide (Amberlite IR 120). Le baryum est ensuite éliminé complètement par passage de la solution sur une colonne de la même résine.

L'ester préparé de cette manière ne contient pas de P inorganique, réagit quantitativement dans le test au *zwischenferment* (voir plus loin) et est hydrolysé à raison de 10% en 3 heures à 100° dans HCl N. Sa valeur de fructose est cependant un peu plus élevée que celle du glucose (voir Tableau II) et laisse soupçonner une légère contamination par le F6P. Celui-ci devrait être formé par épimérisation non enzymatique, car l'enzyme utilisé ne contenait pas d'isomérase. Le rendement global varie entre 85 et 90% (théorique: 94%).

Fructose-diphosphate

Les préparations commerciales de cet ester sont généralement assez impures. Nous avons d'abord utilisé la technique de purification décrite par NEUBERG, LUSTIG ET ROTHENBERG⁷. Dans nos mains, cette méthode n'a pas donné des résultats très satisfaisants.

Plus récemment, nous avons appliqué une technique chromatographique. Le sel de calcium (G.B.I.) est dissous dans l'eau, débarrassé de Ca par passage sur une colonne d'Amberlite IR-120, puis fixé sur une colonne de résine basique (Dowex-2, sous forme chlorure). On élue à l'aide de NH_4Cl , 0.2 M. Le phosphate inorganique sort presque immédiatement, accompagné d'une partie du fructose estérifié. Les fractions suivantes contiennent 70% ou plus du fructose total et sont libres de phosphate inorganique et d'esters monophosphoriques. Neutralisées à la baryte et additionnées d'un volume d'acétone, elles laissent précipiter le fructose-diphosphate de baryum à l'état essentiellement pur. L'élimination du baryum se fait par la technique décrite pour le G6P.

Fructose-6-phosphate

La préparation de F6P par hydrolyse acide du FDP selon NEUBERG *et coll.*⁷ ne nous a pas donné un rendement satisfaisant. Nous lui préférons actuellement l'hydrolyse enzymatique par l'hexose-diphosphatase hépatique, purifiée selon GOMORI⁸.

La Fig. 1 montre, comme l'avait déjà trouvé cet auteur, que l'enzyme libère exactement la moitié du phosphore total de l'ester. La formation quantitative de F6P a été démontrée par un dosage au *zwischenferment* (voir plus loin) et par l'analyse du phosphore acido-labile (25 minutes à 100° dans HCl N). Ces résultats confirment l'opinion de ROCHE ET BOUCHILLOUX⁹ et de LEUTHARDT, TESTA ET WOLF¹⁰, selon laquelle l'hexose-diphosphatase libère spécifiquement le groupement phosphate fixé au carbone 1 de l'ester et montrent en outre que cette spécificité est absolue.

Pour préparer le F6P, l'enzyme est incubé en présence de FDP, de tampon glycolle et de $MgCl_2$, chacun de ces composants se trouvant à concentration $5 \cdot 10^{-2} M$ et le mélange étant porté à pH 9.7 avec NaOH. Lorsque l'équilibre est atteint, on ajoute 0.5 volume d' $HClO_4$ à 20% et une heure plus tard on porte à pH 7.5 avec KOH 5 N. Après une nuit en glacière, le précipité est éliminé par filtration et lavé une fois; on ajoute ensuite 3 moles d'acétate de baryum par mole de FDP utilisée. Le phosphate de baryum est éliminé par centrifugation et lavé soigneusement deux fois. Les liquides surnageants sont combinés et on insolubilise le F6P de Ba par addition de deux volumes d'acétone, on lave et on sèche. Pour obtenir un rendement élevé il est conseillé de concentrer la solution sous vide avant d'ajouter l'acétone.

Le F6P que nous avons préparé par cette méthode contenait environ 4% de G6P, dosable au *zwischenferment* en l'absence d'isomérase. Ce ferment étant absent dans la préparation d'hexose-diphosphatase utilisée, il semble qu'on doive incriminer une épimérisation non enzymatique au cours de la purification, comme dans le cas du G6P.

Fructose-1-phosphate

Nous avons préparé du F1P par synthèse chimique et enzymatique. Cette seconde méthode qui consiste à phosphoryler le fructose aux dépens de l'ATP par la fructokinase purifiée de foie de boeuf a été décrite antérieurement (HERS¹¹).

La synthèse chimique du F1P* a été réalisée selon BRIGL ET MULLER¹² par phos-

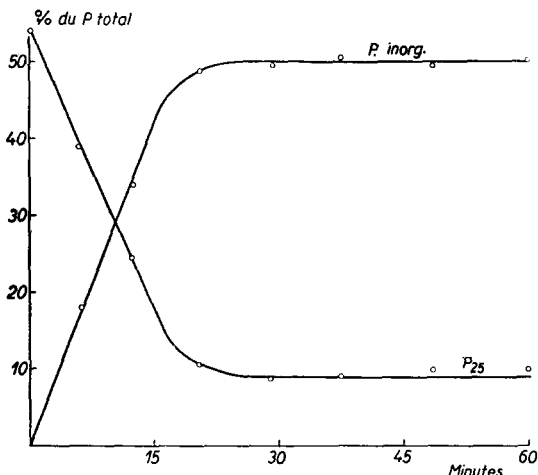


Fig. 1. Transformation enzymatique du FDP en F6P. Chaque tube contient $1.5 \mu M$ de FDP et 0.1 ml d'enzyme préparé selon GOMORI⁸, ainsi que $MgCl_2$ $0.03 M$ et un tampon glycolle $0.03 M$ pH 9.5. La chute du P_{25} correspond exactement à la formation de F6P (voir Tableau II). Le dernier tube contenait $1.47 \mu M$ de F6P, dosé par le *zwischenferment* en présence d'isomérase.

* Cette synthèse a été réalisée par l'un de nous (H.G.H.) au cours de son séjour au "Sir William Dunn Institute" à Cambridge.

Le Dr D. J. BELL est ici remercié de l'aide qu'il lui a apportée au cours de ce travail.

phorylation du 2,3-4,5 diacétone-fructose au moyen de diphényl-phosphate, suivie d'élimination des groupements phényles par hydrogénation et des groupements acétones par hydrolyse acide. Le diacétone-fructose a été préparé par la méthode de BELL¹³. L'hydrolyse finale des groupements acétones a été réalisée comme conseillé par LEUTHARDT ET TESTA¹⁴ sans obtenir cependant le rendement indiqué par ces auteurs; l'opération a été répétée deux fois, le FIP de baryum étant chaque fois séparé de son dérivé monoacétone par précipitation au moyen d'un volume d'acétone, suivie de lavages.

D-Glycéraldéhyde

La D-glycéraldéhyde a été préparée à partir de mannitol par la technique de BAER ET FISCHER¹⁵. La solution obtenue, titrée par iodométrie, avait une concentration de 3.35 % et un pouvoir rotatoire de $+0.66^\circ$ (2 dm) soit $[\alpha]_D^{20} = +9.8^\circ$ (d'après BAER ET FISCHER: $+9.6^\circ$).

FIXATION ET SEPARATION

Les techniques de déprotéinisation influencent la composition du mélange et limitent l'applicabilité des méthodes analytiques. Nous utilisons les filtrats suivants.

1. *Filtrats TCA*. Obtenu par fixation à l'acide trichloracétique (TCA) à 8 %, le filtrat TCA contient intégralement tous les composants du mélange. Il peut être débarrassé de TCA par 4 extractions successives à l'éther. Ce dernier est éliminé par évaporation, après quoi on ramène au volume initial avec de l'eau (filtrat TCA/éther).

2. *Filtrats PC*. On fixe avec l'acide perchlorique (PC) qui doit se trouver à une concentration finale d'au moins 8 % (NEUBERG, STRAUSS ET LIPKIN¹⁶). Le filtrat PC a la même composition que le précédent. L'acide perchlorique peut être éliminé par neutralisation au KOH et filtration à froid de son sel de potassium (filtrat PC/KOH).

3. *Filtrat ZB*. Il est obtenu par déprotéinisation selon WEICHSELBAUM ET SOMOGYI¹⁷, à l'aide de quantités équimoléculaires de $ZnSO_4$ et de $Ba(OH)_2$. Ces réactifs séparent très efficacement les sucres libres des esters phosphorés, qui sont adsorbés par le précipité¹⁸. L'adsorption des sucres libres est généralement négligeable, mais l'ordre dans lequel les réactifs sont ajoutés a une grande importance au point de vue de la stabilité des sucres. Si la baryte est ajoutée avant le sulfate de zinc, la réaction fortement alcaline provoque une dégradation progressive qui ne s'arrête qu'au moment où on neutralise au sulfate de zinc. Si l'addition de ce dernier précède celle de la baryte, la dégradation ne se produit pas. Elle est particulièrement importante dans le cas des trioses libres, comme le montre la Fig. 2. Les hexoses sont affectés beaucoup plus

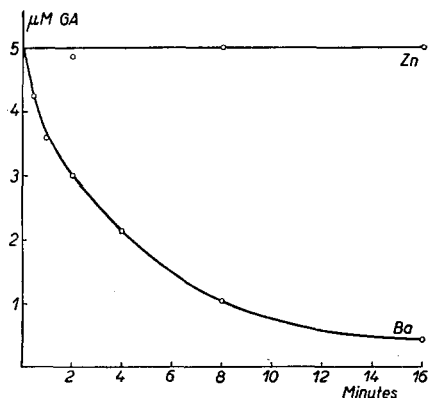


Fig. 2. Destruction de la glycéraldéhyde par $Ba(OH)_2$. 5 μM de GA sont traitées avec 2.5 ml de $ZnSO_4$ ou de $Ba(OH)_2$ 0.3 N. Le mélange reste à température de la chambre pendant un temps variable, puis on ajoute 2.5 ml du réactif complémentaire, on mélange et on filtre. La GA restante est dosée sur le filtrat.

lentement, mais cependant d'une manière significative. Dans le cas du fructose, la capacité de former du furfural et le pouvoir réducteur diminuent simultanément et

tombent à 82–84% de leur valeur initiale après une heure de séjour dans la baryte. L'addition de celle-ci en premier lieu présente en outre l'inconvénient d'amorcer l'hydrolyse des trioses-phosphates. Pour ces raisons, nous ajoutons toujours ZnSO_4 avant Ba(OH)_2 . La déprotéinisation est tout aussi efficace.

L'adsorption des hexoses-phosphates par le mélange Zn/Ba peut également se faire sur des filtrats TCA ou PC après neutralisation (filtrats TCA/ZB, PC/ZB) ou élimination de l'acide (filtrats TCA/éther/ZB, PC/KOH/ZB).

HYDROLYSE

Hydrolyse acide

Le Tableau I résume les données que nous avons établies concernant la vitesse d'hydrolyse des divers esters phosphorés mentionnés. Ces données sont en accord avec celles de la littérature. Il est à remarquer qu'elles ne sont applicables que pour autant que le mélange ne contienne pas d'autres substances susceptibles d'influencer la vitesse d'hydrolyse des composés phosphorés. Nous avons notamment constaté que les ions perchlorates accélèrent cette hydrolyse. Aussi est-il nécessaire d'effectuer celle-ci sur des filtrats PC/KOH.

TABLEAU I
HYDROLYSE ACIDE DES ESTERS PHOSPHORÉS
Pourcent du P libéré

Minutes dans HCl N, 100°	7	10	25
Glucose-1-phosphate	100	100	100
Glucose-6-phosphate	0.4	0.5	1.3
Fructose-1-phosphate	63	77	99
Fructose-6-phosphate	5.5	8	18.5
Fructose-1-6-diphosphate	26.5	35	55.0 (11.0)*
Trioses-phosphates**	44	56	83

* Entre parenthèses: fructose libéré en pourcent du fructose total.

** Valeurs empruntées à FISCHER ET BAER^{19,20} et KIESSLING²¹.

Hydrolyse alcaline

Effectuée selon les indications de LOHMANN ET MEYERHOF²², (20 minutes à la température ordinaire dans KOH N) elle libère spécifiquement le phosphore des trioses-phosphates. Nous avons vérifié que les autres esters ne sont pas attaqués dans ces conditions.

TECHNIQUES ANALYTIQUES

Fructose et dérivés

Nous avons adopté la technique décrite par ROE, EPSTEIN ET GOLDSTEIN²³, pour le dosage de l'inuline en y apportant de légères modifications. Appliquée au fructose et à ses esters, cette technique présente trois inconvénients, que nous avons essayé de réduire au minimum:

1. Le spectre d'absorption du colorant formé est aisément modifié par la présence

d'impuretés. Normalement, la solution a une couleur ocre et présente deux maxima d'absorption, à 520 et à 400 $m\mu$. Dans certains cas, elle a une teinte rougeâtre et présente un maximum supplémentaire à 560 $m\mu$ (Fig. 3). La loi de Beer-Lambert n'est plus obéie. Nous n'avons pas pu identifier l'impureté responsable de cette réaction anormale. Elle est présente dans certains échantillons d'acide acétique pour analyse, dans l'alcool éthylique, l'éther et l'acétate d'éthyle. La distillation fractionnée ne permet pas de l'éliminer. D'autre part, les trioses réagissent faiblement en donnant une coloration pourpre avec un maximum unique à 560 $m\mu$.

Nous n'avons pas réussi à améliorer le dosage en modifiant la composition des réactifs recommandée par ROE *et coll.*²³, mais nous avons constaté que la température exerce une grande influence sur le spectre d'absorption du colorant. Comme le montre la Fig. 3, la bande à 560 $m\mu$ augmente, en même temps que celle à 520 $m\mu$ diminue, au fur et à mesure qu'on élève la température de 75° à 85°. La prolongation du chauffage augmente également l'importance de la bande à 560 $m\mu$.

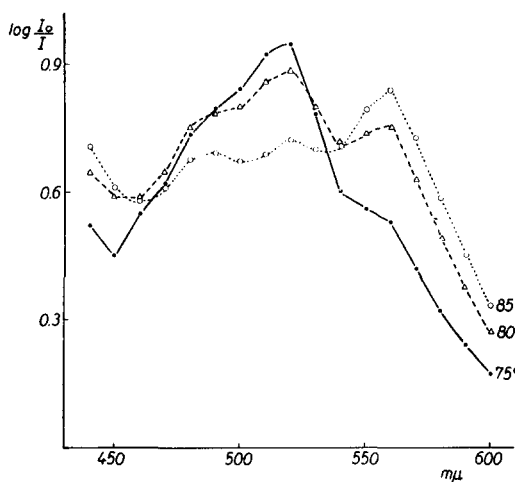


Fig. 3. Dosage de fructose. Influence de la température de chauffage sur le spectre d'absorption. Une μM de fructose traitée selon ROE *et coll.*²³. Chauffage 13 minutes aux températures indiquées. Spectre d'absorption mesuré au spectrophotomètre de Beckman (modèle DU) avec cuvettes de 1 cm.

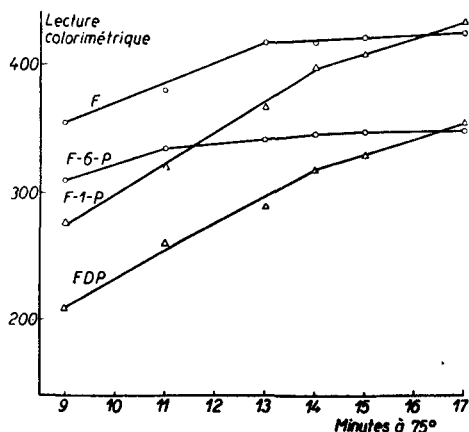


Fig. 4. Dosage du fructose et de ses esters. Influence du temps de chauffage à 75° sur la lecture colorimétrique. Chaque tube contient 1 micromole, traitée selon ROE *et coll.*²³. Chauffage à 75°. Lectures colorimétriques effectuées au photocalorimètre de Klett-Summerson (filtre 50).

2. La réaction se fait à chaud et en milieu fortement acide. De ce fait les esters du fructose sont progressivement hydrolysés au cours du dosage et leur contribution dépend étroitement de la température à laquelle on opère et de la durée du chauffage. La Fig. 4 illustre l'influence du temps de chauffage à 75° sur la lecture colorimétrique dans le cas du fructose et de ses trois esters.

3. Une dernière difficulté de la méthode réside dans le fait que les solutions de fructose perdent progressivement leur titre, probablement par épimérisation, car le pouvoir réducteur ne se modifie pas.

Tenant compte de ces diverses observations, nous avons adopté le mode opératoire suivant : les réactifs sont ceux de ROE *et coll.*²³, mais on veille à utiliser de l'acide acétique aussi dépourvu que possible de l'impureté gênante. L'acide acétique Merck P.A. nous

a donné satisfaction. On procède comme dans la technique originale, mais le chauffage se fait à 75° au lieu de 80°, durant 15 minutes. Finalement, on emploie comme étalon une solution de saccharose conservée dans l'acide benzoïque à 0.25 % et qu'on hydrolyse préalablement par un chauffage de 20 minutes au bain-marie bouillant dans HCl 0.01 N. Sa valeur colorimétrique est multipliée par 0.99 pour tenir compte de la légère contribution du glucose.

La méthode décrite peut être appliquée de diverses manières. Nous distinguons :

a. *Fructose total* (F_t) : Sur filtrats TCA ou PC. Mesure la somme du fructose et de ses esters avec de faibles contributions des autres composants.

b. *Fructose libre* (F_l) : Sur filtrats ZB. Mesure essentiellement le fructose libre avec de faibles contributions des autres sucres.

c. *Fructose acido-labile* (F_{25}) : Différence entre le fructose libre présent après 25 minutes d'hydrolyse acide et le fructose libre initial. Représente la contribution des sucres libérés par l'hydrolyse (principalement le fructose du FIP). On utilise une technique analogue à celle de CORI, OCHOA, SLEIN ET CORI²⁴ : le filtrat TCA/éther ou PC/KOH* est additionné d'HCl jusqu'à concentration normale ; on chauffe 25 minutes au bain-marie bouillant, neutralise soigneusement à l'aide de NaOH et traite ensuite au mélange Zn/Ba.

Dans tous les cas, nous commençons par exprimer les résultats de ces dosages en micromoles de fructose (voir plus loin pour corrections).

Sucres réducteurs

Nous utilisons la méthode de NELSON²⁵ sans modification. L'étalon est une solution de glucose conservée dans l'acide benzoïque à 0.25 %. Les résultats des dosages sont exprimés en micromoles de glucose (sauf pour T). Nous distinguons :

a. *Sucres réducteurs totaux* (R_t) : Sur filtrat TCA/éther ou PC neutralisé**. Mesure la totalité des corps réducteurs du filtrat.

b. *Sucres réducteurs libres* (R_l) : Sur filtrat ZB, pour autant qu'il ne contienne pas de trichloracétate. Mesure les sucres libres.

c. *Trioses* (T) : Sur les mêmes filtrats que le précédent. Consiste en une modification de la technique de RUDNEY²⁶ pour le dosage des trioses. On opère comme dans la méthode de NELSON, mais on chauffe à 80° durant 2 minutes. L'étalon est la solution-stock de glycéraldéhyde, conservée congelée dans un flacon hermétique. Le résultat est exprimé en micromoles de glycéraldéhyde.

Phosphore inorganique

Il est dosé selon la méthode de FISKE ET SUBBAROW²⁷, les lectures colorimétriques étant faites 10 minutes exactement après l'addition de l'acide amino-naphtol-sulfonique. Dans ces conditions l'hydrolyse des composés labiles au cours du dosage est négligeable. Nous distinguons :

a. *P inorganique* (P_i) : Sur filtrats TCA ou PC, sans traitement préalable.

b. *P. acidolabile* (P_{25}) : Différence entre le P inorganique présent après 25 minutes

* Il faut éliminer les acides utilisés pour la fixation, étant donné leur influence sur l'hydrolyse (voir plus haut).

** Le dosage exige un filtrat neutre ; il est influencé par l'ion trichloracétate mais non par l'ion perchlorate.

d'hydrolyse dans HCl *N* à 100° et le P inorganique initial. Se fait sur filtrat TCA/éther ou PC/KOH.

c. *P alcalinolabile* (P_a): Différence entre le P inorganique présent après hydrolyse alcaline, comme décrit plus haut, et le P inorganique initial. Correspond au P des trioses-phosphates.

d. *P total* (P_t): Après minéralisation complète selon LEPAGE²⁸.

Glucose-6-phosphate (Z)

Cet ester est mesuré selon SLEIN, CORI ET CORI²⁹ par son aptitude à causer spécifiquement la réduction du triphospho-pyridine-nucléotide (TPN) en présence de glucose-6-phosphate-déshydrogénase (*zwischenferment*). Le ferment est préparé à partir de levure basse par la technique de WARBURG ET CHRISTIAN³⁰. Le TPN est extrait d'une bouillie de foie de boeuf par adsorption sur charbon (Darco), d'après LEPAGE ET MUELLER³¹ et purifié chromatographiquement sur Dowex-2, selon la méthode de KORNBERG ET HORECKER³².

On doit opérer sur filtrat TCA/éther ou PC/KOH, car les ions trichloracétate et perchlorate inhibent le *zwischenferment*. On introduit dans une cuvette de 1 cm (spectrophotomètre de Beckman, modèle DU) la quantité de filtrat à analyser, 0.5 μM de TPN, 0.2 ml d'un tampon TRIS pH 8.0 et de l'eau jusqu'à 2.9 ml. On déclenche la réaction par l'addition de 0.1 ml de *zwischenferment* et on suit l'augmentation de l'absorption à 340 m μ jusqu'à ce que celle-ci ait atteint un plateau.

D'après HORECKER ET KORNBERG³³, le coefficient d'extinction moléculaire du TPNH vaut 6.22 $\cdot 10^6$ cm² mole⁻¹. Par conséquent, une valeur de $\log I_0/I$ égale à 1 correspond à 0.482 micromoles de TPNH ou de glucose-6-phosphate, dans 3 ml.

APPLICATIONS

Le Tableau II montre la contribution des corps étudiés aux divers dosages qui ont été décrits dans la section précédente.

On remarque que très peu de dosages sont spécifiques d'un seul corps. Aussi est-il nécessaire, pour l'analyse d'un mélange complexe, de recourir à une méthode algébrique. On effectue le nombre de dosages requis* et exprime les résultats en micromoles de l'étalon. Les données du Tableau II permettent alors d'établir un système de *n* équations à *n* inconnues, dont la solution fournit la composition du mélange.

L'inconvénient de ce procédé est qu'il ne permet pas de tenir compte de l'imprécision inhérente aux méthodes de dosage et peut même, lorsque certains composés sont peu abondants, donner des résultats absurdes. En général, il est assez facile, une fois les équations résolues, d'effectuer les corrections qui paraissent les plus raisonnables. De plus, il est recommandable d'ajouter au moins une détermination supplémentaire, servant à vérifier l'exactitude des conclusions.

A titre d'exemple, nous avons résumé au Tableau III les résultats d'un bilan complet qui figurera dans une publication ultérieure (HERS ET KUSAKA³⁵). Dans la première colonne figurent les 9 données analytiques obtenues expérimentalement. La composition du mélange, calculée à partir de ces valeurs et des données du Tableau II

* Tous les dosages peuvent se faire sur le même filtrat PC/KOH, une partie de celui-ci pouvant être traitée au mélange Zn/Ba.

TABLEAU II

Dosage	Etalon	Valeur analytique, exprimée en micromoles de l'étalon, fournie par 1 micromole de									
		G	F	T	GIP	G6Pb	FIP	F6Pd	FDP	TP	Pi
F_t	Fa	0.01	1	0.01	0.01	(0.01) ^c	0.97	0.82	0.78	0.01	—
F_l	F	0.01	1	0.01	—	—	—	—	—	—	—
F_{25}^e	F	—	—	—	0.01	0	0.99	0.185	0.11	0.01	—
R_t	G	1	1	0.5	0	0.81	0.68	0.81	0.59	0.5	—
R_l	G	1	1	0.5	—	—	—	—	—	—	—
T	GA	0	0.34 ^f	1	—	—	—	—	—	—	—
P_t	P	—	—	—	1	1	1	1	2	1	1
P_i	P	—	—	—	0	0	0	0	0	0	1
P_{25}^e	P	—	—	—	1	0.013	0.99	0.185	1.1	0.83	—
P_a	P	—	—	—	0	0	0	0	0	1	—
Z	—	—	—	—	—	1	—	0	—	—	—

^a Etalon fructose = saccharose hydrolysé corrigé pour glucose (voir texte).

^b Sauf pour la réaction du *zwischenferment*, les valeurs analytiques du mannose-6-phosphate sont très semblables à celles du G6P³⁴.

^c Sur l'échantillon de G6P purifié, nous avons trouvé 0.025. Cette valeur est presque certainement due à la présence de traces de F6P formé par épimérisation au cours de la purification (voir plus haut).

^d Les valeurs analytiques du F6P ont été corrigées pour la présence de G6P dans la préparation utilisée (voir plus haut).

^e Les valeurs analytiques pour d'autres temps d'hydrolyse peuvent être calculées à partir des données du Tableau I.

^f Cette valeur varie assez fortement selon les conditions expérimentales. La présence de tampon TRIS notamment peut modifier la vitesse d'oxydation des trioses et du fructose, mais pas nécessairement dans le même rapport.

TABLEAU III

RÉSULTATS D'UNE ANALYSE COMPLÈTE

Résultats bruts		Résultats corrigés	
Données expérimentales	Valeurs calculées	Valeurs corrigées	Données correspondantes
$F_t = 8.23$	G = 0	G = 0	$F_t = 8.07$
$F_l = 1.13$	F = 1.08	F = 1.08	$F_l = 1.13$
$F_{25} + F_t = 7.84$	T = 4.96	T = 4.96	$F_{25} + F_t = 7.83$
$R_t = 3.56$	G6P = 1.656	G6P = 1.25	$R_t = 3.56$
$T = 5.33$	F1P = 6.603	F1P = 6.66	$T = 5.33$
$P_t = 13.25$	F6P = 1.058	F6P = 0.56	$P_t = 13.27$
$P_i = 4.20$	FDP = -0.25	FDP = 0	$P_i = 4.20$
$P_{25} + P_i = 10.87$	TP = 0.23	TP = 0.23	$P_{25} + P_i = 11.11$
$P_a + P_i = 4.43$	$P_i = 4.2$	$P_i = 4.2$	$P_a + P_i = 4.43$
$Z = 1.25$	G6P vrai = 1.25	(M6P = 0.37)	

est représentée dans la deuxième colonne. On note immédiatement la valeur négative du FDP. Ce fait n'a rien d'étonnant, car on se trouve en présence de grandes quantités de FIP, de sorte que l'on ne peut espérer obtenir de chiffres précis pour le FDP, ni encore pour les hexoses-6-phosphates. On note d'ailleurs que la valeur du G6P trouvée par le calcul ne correspond pas au résultat du dosage par le *zwischenferment*.

Pour corriger les résultats, on a admis 1. que le FDP était négligeable; 2. que le système contenait le F6P en équilibre avec le G6P vrai. Cette seconde hypothèse était admissible car il s'agissait d'un mélange ayant incubé une heure en présence d'isomérase.

Remplaçant le G6P et le F6P par leurs valeurs dans les équations correspondant aux F_i , F_{25} et P_{25} , on a calculé trois valeurs de FIP, notamment: 6,864, 6,700 et 6,410, dont on a pris la moyenne. Finalement, constatant que le système accusait encore ainsi un léger excès de phosphore acido-stable, on a supposé que cette différence correspondait à du mannose-6-phosphate (M6P), en équilibre avec le F6P et le G6P. Pour les équilibres isomériques, on s'est basé sur les chiffres de SLEIN³⁶: G6P = 57.4%; F6P = 25.5% et M6P = 17.1%. Les valeurs calculées de cette manière figurent dans la troisième colonne du Tableau III. Les chiffres de la quatrième colonne correspondent aux valeurs analytiques que devraient théoriquement donner un mélange ayant la composition supposée. On constate que ces chiffres ne s'écartent pas de plus de 2% des valeurs trouvées réellement, et ceci dans deux dosages seulement (F_i et $P_{25} + P_i$).

DISCUSSION

Parmi les dosages étudiés, le plus délicat est celui du fructose et de ses esters. Aussi n'est-il pas étonnant que des valeurs très variables soient renseignées à ce sujet dans la littérature, (voir LUTWAK ET SACKS³⁷).

Le bilan décrit ci-dessus illustre en même temps les possibilités et les limitations des méthodes examinées. Il est évident que lorsque le nombre de contributions individuelles aux valeurs expérimentales devient trop élevé, la résolution algébrique du système en ses composants devient de plus en plus aléatoire. Elle nous a cependant permis, en introduisant une seule hypothèse, d'ailleurs fort plausible, d'établir une série de valeurs qui, comme il sera montré dans une publication ultérieure, concordent parfaitement avec l'ensemble des données expérimentales fragmentaires obtenues par d'autres moyens³⁵.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été subsidié par les "Lilly Research Laboratories".

RÉSUMÉ

1. Les auteurs décrivent les techniques qu'ils utilisent pour la préparation d'échantillons purifiés de glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-1-phosphate, fructose-6-phosphate et fructose-diphosphate.

2. Ils ont réexaminé les méthodes analytiques utilisées pour le dosage de ces esters, ainsi que pour celui du glucose, du fructose et des trioses. Certaines causes d'erreur ont été mises en lumière et les modes opératoires ont été modifiés en conséquence.

3. La contribution des composés envisagés à chaque type d'analyse a été déterminée, de manière à permettre leur dosage isolément ou dans des mélanges.

SUMMARY

1. The authors describe the techniques in use in their laboratory for the preparation of purified samples of glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-1-phosphate, fructose-6-phosphate and fructose-diphosphate.

2. They have re-examined the analytical methods used for the determination of these esters, as well as of glucose, fructose and trioses. Various causes of error have been brought to light and the procedures have been modified accordingly.

3. The contributions of the substances studied to each type of analysis have been measured, in order to make it possible to determine them individually and in mixtures.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Autoren beschreiben die Methoden, die sie zur Darstellung von gereinigten Proben von Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-1-phosphat, Fructose-6-phosphat und Fructose-diphosphat benützten.

2. Sie überprüften die zur Bestimmung dieser Ester, sowie von Glucose, Fructose und Triosen benützten analytischen Methoden. Gewisse Fehlerquellen wurden aufgedeckt und die Arbeitsweise folglich abgeändert.

3. Um die Bestimmung der betrachteten Verbindungen allein oder in ihren Mischungen zu ermöglichen wurden die Beiträge, die sie zu jeder Analysenart liefern bestimmt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. S. HANES, *Proc. Roy. Soc. B*, 129 (1940) 174.
- ² J. B. SUMNER ET G. F. SOMERS, *Arch. Biochem.*, 4 (1944) 11.
- ³ R. M. MACCREADY ET W. Z. HASSID, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 560.
- ⁴ S. P. COLOWICK ET E. W. SUTHERLAND, *J. Biol. Chem.*, 144 (1942) 423.
- ⁵ V. A. NAJJAR, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 281.
- ⁶ E. SUTHERLAND, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 1279.
- ⁷ C. NEUBERG, H. LUSTIG ET M. A. ROTHENBERG, *Arch. Biochem.*, 3 (1943) 33.
- ⁸ G. GOMORI, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 139.
- ⁹ J. ROCHE ET S. BOUCHILLOUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 739.
- ¹⁰ F. LEUTHARDT, E. TESTA ET H. P. WOLF, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 227.
- ¹¹ H. G. HERS, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 416.
- ¹² P. BRIGL ET H. MÜLLER, *Ber.*, 72 (1939) 2121.
- ¹³ D. J. BELL, *J. Chem. Soc.*, (1947) 1461.
- ¹⁴ F. LEUTHARDT ET E. TESTA, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 931.
- ¹⁵ E. BAER ET H. O. L. FISCHER, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 463; *Helv. Chim. Acta*, 17 (1934) 622.
- ¹⁶ C. NEUBERG, E. STRAUSS ET L. E. LIPKIN, *Arch. Biochem.*, 4 (1944) 101.
- ¹⁷ T. E. WEICHELBAUM ET M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 5.
- ¹⁸ S. P. COLOWICK, G. T. CORI ET M. W. SLEIN, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 583.
- ¹⁹ H. O. L. FISCHER ET E. BAER, *Ber.*, 65 (1932) 337, 1040.
- ²⁰ E. BAER ET H. O. L. FISCHER, *J. Biol. Chem.*, 150 (1943) 223.
- ²¹ W. KIESLING, *Ber.*, 167 (1934) 869.
- ²² K. LOHMAN ET O. MEYERHOF, *Biochem. Z.*, 273 (1934) 60.
- ²³ J. H. ROE, J. H. EPSTEIN ET N. P. GOLDSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 839.
- ²⁴ G. T. CORI, S. OCHOA, M. W. SLEIN ET C. F. CORI, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 304.
- ²⁵ N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375.
- ²⁶ H. RUDNEY, *Arch. Biochem.*, 23 (1949) 67.
- ²⁷ C. H. FISKE ET Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.
- ²⁸ G. A. LEPAGE, dans W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS ET J. L. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co, Minneapolis (1949).
- ²⁹ M. W. SLEIN, G. T. CORI ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 763.
- ³⁰ O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 254 (1932) 438.
- ³¹ G. A. LEPAGE ET G. C. MUELLER, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 975.
- ³² A. KORNBERG ET B. L. HORECKER, communication personnelle.
- ³³ B. L. HORECKER ET A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 385.
- ³⁴ R. ROBISON, *Biochem. J.*, 26 (1932) 2191.
- ³⁵ H. G. HERS ET T. KUSAKA, *Biochim. Biophys. Acta*,
- ³⁶ M. W. SLEIN, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 753.
- ³⁷ L. LUTWAK ET J. SACKS, *Arch. Biochem.*, 39 (1952) 240.

Reçu le 24 avril 1953