

ÉTUDE SUR LA SIMPLIFICATION DE LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE PAR L'UTILISATION DES MATIÈRES COLORANTES.

Par

MAKI TAKATA.

(高田 蒔)

*(Du laboratoire de chimie médicale de l'Université de Sendai,
dirigé par Prof. Katsuji Inouye.)*

On fait de plus en plus usage, actuellement, de la colorimétrie. C'est une méthode de nature à permettre une détermination quantitative à la fois rapide et bien sûre. Malgré les avantages qu'elle présente, elle est encore loin d'être assez généralement utilisée ; cela tient surtout à des difficultés qui s'opposent souvent à ce que l'on prépare la liqueur témoin qui en joue le premier rôle ; c'est ce qui, en vue des applications pratiques, diminue beaucoup la valeur de la méthode.

Il serait certainement plus rationnel de préparer le témoin, en prenant une solution titre connue de la substance à déterminer et en la traitant pour donner naissance à la coloration déterminée que l'on compare au colorimètre. Mais, c'est ce qui n'est pas toujours facile. Voici les causes principales de ces difficultés : tantôt la substance est impossible à mesurer précisément, tantôt la teinte produite ne persiste que peu de temps. Ce sont ces difficultés à cause desquelles, pour obtenir le témoin, nous devons faire une opération trop compliquée ou la répéter si fréquemment dans une série d'expériences.

Par suite, il serait avantageux, si l'on pouvait éviter ces obstacles, en remplaçant la solution témoin par un liquide identiquement coloré, que l'on peut aisément obtenir, et dont la teinte persiste. Tel est le cas, bien connue, dans la détermination colorimétrique de la créatinine. C'est donc là le but du présent travail, dans lequel je me suis précoc-

cupé de trouver des matières convenables qui peuvent servir en faveur de certaines méthodes colorimétriques.

I. Disposition générale des recherches.

J'ai toujours commencé à préparer, en suivant exactement les indications, la solution témoin qui doit être remplacée avec une autre solution stable et dont le caractère optique a été examiné en détail. Puis, des matières colorantes présentant une couleur semblable ont été dissolues, et en telle quantité qui donne l'intensité de même degré que le témoin prescrit.

Parmi ces dissolutions colorantes, l'une, dont la teinte se rapproche le plus du témoin prescrit, a été choisie. Les petites différences existantes entre elles, ayant été soigneusement examinées, ont été autant que possible corrigées par addition d'autres substances convenables. Mon attention s'est appliqué à obtenir l'égalité de nuance et d'intensité au moment où j'examinais deux témoins en couche d'épaisseur égale.

Quant au procédé lui-même, je l'ai laissé le plus possible selon sa façon originale.

Il faut de plus reconnaître que, quand on fait dissoudre des différents échantillons d'une matière colorante, les solutions résultantes peuvent être un peu différentes dans la teinte, bien qu'elles aient été préparées suivant toutes les indications voulues. En général, cette variation deviendra considérable entre les échantillons provenant de différentes fabriques. À cet effet, il vaut mieux, lorsqu'on voudra employer les témoins présentés dans cette communication, qu'on détermine tout d'abord leur titre, en le comparant au témoin antérieur (original).

II. Procédé colorimétrique pour le dosage de l'acide urique.

Ce procédé qui s'appuie sur la réaction colorante entre l'acide urique et l'acide phosphotungstique a été proposé pour la première fois par Folin et ses collaborateurs¹⁾. Il a reçu de suite de différents auteurs des modifications destinées à lui donner une façon plus pratique et plus précise. Les problèmes essentiels ont consisté d'abord dans la séparation de l'acide urique, ensuite dans les conditions favor-

1) O. Folin et A. B. Macallum, *Jl. of Biol. Chem.*, **11** (1912), 265; **13** (1912), 363. O. Folin et W. Denis, *Jl. of Biol. Chem.*, **12** (1912), 239; **13** (1912), 469.

ables pour la naissance d'une réaction nette, enfin, et ce qui est l'objet de ma présente étude, dans la découverte d'un témoin permanent.

Folin et Macallum ont déjà travaillé long temps pour trouver un témoin stable. Mais, leur travaux n'ont pas réussi.

Ensuite, Folin et Denis¹⁾ ont recommandé pour cet objet l'emploi d'un composé d'acide urique et d'aldehyde formique. Mais, Benedict et Hitchcock²⁾ n'ont pas pu constater son effet.

Les derniers auteurs, dans le but de la rendre stable, ont préféré dissoudre l'acide urique dans un milieu contenant pyridine ou phosphate de sodium. Afin de donner à la coloration une bonne propriété ils y ont introduit aussi cyanure de potassium. D'après Curtman et Freed³⁾, il vaudrait mieux que l'on remplace l'acide acétique par l'acide borique, dans le témoin additionné de phosphate de Benedict.

Aussi Bogert⁴⁾, en se rendant compte des faits que la coloration change rapidement de teinte et encore se trouble très souvent, a amélioré la méthode sur points divers.

Après un long silence à ce sujet, Folin en collaboration avec Wu⁵⁾ a publié tout récemment qu'ils sont arrivé enfin à un beau témoin en y ajoutant du sulfite.

En effet nous avons aujourd'hui plusieurs témoins au dosage colorimétrique d'acide urique. Malgré cela, comme il a été manifesté par plusieurs essais de contrôle, un témoin préparé d'une solution d'acide urique n'est pas assez durable et parfois même incertain, quelque soit la manière de la préparer.

Cependant, l'un des dérivés sulfoniques de la rosaniline triphénylée, qui se trouve dans le commerce sous le nom de bleu à l'eau, à l'état d'une dissolution étendue acidifiée, présente à peu près la même teinte que l'on compare dans le dosage de l'acide urique; mais, elle est légèrement plus rougeâtre. Mais, lorsqu'on y ajoute un peu de sulfate de cuivre qui absorbe les rayons rouges, il résulte une liqueur de la teinte identique à la dernière.

La difficulté notée par Folin et Macallum qu'une solution

1) O. Folin et W. Denis, *Jl. of Biol. Chem.*, **14** (1913), 95.

2) S. R. Benedict et E. H. Hitchcock, *Jl. of Biol. Chem.*, **20** (1915), 619; S. R. Benedict, *Jl. of Biol. Chem.*, **20** (1915), 629.

3) L. J. Curtman et M. Freed, *Jl. of Biol. Chem.*, **28** (1916), 89.

4) L. J. Bogert, *Jl. of Biol. Chem.*, **31** (1917), 165.

5) O. Folin et H. Wu, *Jl. of Biol. Chem.*, **38** (1919), 100 et 459.

des matières colorantes est trop claire, peut être résolue par addition de nigrosine qui la rend sombre.

A.—DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE DANS L'URINE PAR
LE PROCÉDÉ DE BOGERT.¹⁾

Ce procédé, à mon avis, est le meilleur de tous. Voici la composition du mélange destiné pour ce procédé.

Solution de bleu à l'eau ²⁾ à 0 ^{gr} ,1 par litre	20 c.c.
HCl (D=1,050)	20 „
SO ⁴ Cu-5H ² O à 10 pour 100	12 „
Solution de nigrosine ³⁾ à 0 ^{gr} ,01 par litre	10 „
Eau distillée q. s. pour	100 „

J'ai répété l'examen comparatif, au moyen du colorimètre de Duboscq, entre ce mélange et la solution étalon d'après Bogert et j'ai toujours trouvé que l'intensité de la teinte du mélange, observée sous l'épaisseur de 10^{mm},5 est égale à celle de la dernière, observée sous l'épaisseur de 10 m.m.

Bien plus, ce mélange, en couche de 10^{mm},5 d'épaisseur long, donne devant un spectroscope une image identique à celle de la liqueur témoin de Bogert, examinée sous l'épaisseur de 10 m.m.

Les dosages colorimétriques pratiqués sur des solutions, titre connue, d'acide urique ont donné des résultats satisfaisants. Ils sont réunis dans le tableau suivant.

TABLEAU I

Numéro des solutions	Teneur en acide urique dans 5 c.c. de la solution. en mgr.	
	Trouvé	Calculé
1	1,190	1,200
2	1,000	1,000
3	0,595	0,600
4	0,198	0,200

L'ensemble de ces faits suffisent à indiquer nettement que ce mélange pourrait être utilisé comme étalon dans la détermination

1) L. J. Bogert, *Jl. of Biol. Chem.*, 31 (1917), 165.

2) Bleu à l'eau, Grüber.

3) Nigrosine soluble dans l'eau, Grüber.

colorimétrique d'acide urique. Il va sans dire que l'on doit régler, en ce cas, l'épaisseur du témoin à 10^{mm},5 correspondant à 10 m.m. du témoin de Bogert.

Enfin, il faut noter que j'ai constaté que ce mélange est assez durable; il a été conservé en un lieu obscur 6 mois, jusqu'ici, il ne pâlit point du tout.* Après tout, par l'emploi de ce nouveau témoin le problème discuté longtemps doit être résolu.

B.—DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE DANS L'URINE PAR
LE PROCÉDÉ DE FOLIN ET WU.¹⁾

Ce procédé est caractérisé en ce que l'acide urique est dissolu dans une solution de sulfite de soude à 10 p. 100. Quoique ce dernier sel puisse servir avantageusement pour produire la belle couleur foncée, le procédé lui-même, en tout, n'est pas bon; j'ai constaté par des expériences répétées ce qu'il donne des résultats variants. Mais, si l'on se sert d'une solution à 20 p. 100 de carbonate de soude au lieu d'une solution saturée, comme il a été appliqué par Benedict et Hitchcock, le dosage présente une précision suffisante.

Un mélange de la composition suivante peut remplacer le témoin, dans la condition qui vient d'être écrite..

Solution de bleu à l'eau, à 0 ^{gr} ,1 par litre	3 c.c.
„ „ nigrosine „ „ „	10 „
„ „ SO ⁴ Cu·5H ² O à 10 pour 100	5 „
Acide chlorhydrique (D=1,050)	10 „
Eau q. s. pour	100 „

Une couche d'épaisseur de 24^{mm},5 du mélange possède une intensité entièrement identique avec une couche d'une longueur de 20 m.m. du témoin de Folin et Wu, modifié par moi.

C.—DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE DANS LE SANG PAR
LE PROCÉDÉ DE FOLIN ET WU.²⁾

D'après Folin et Wu, la méthode précédente peut être appliquée aussi pour doser l'acide urique dans le sang. Dans ce dernier

1) O. Folin et H. Wu, JI. of Biol. Chem., 38 (1919), 459.

2) O. Folin et H. Wu, JI. of Biol. Chem., 38 (1919), 100.

* Une solution de bleu à l'eau ajouté acide chlorhydrique ainsi que le mélange conservée en un lieu obscur, est durable. Une solution non-acidifiée du bleu, au contraire, change vite de teinte.

cas, on doit préparer au moins deux témoins qui renferment 0,1 resp. 0,2 milligrammes d'acide urique dans 50 c.c.

Les mélanges qu'ils suivent sont capable de remplacer les témoins à l'acide urique.

Mélange A.

Solution de bleu à l'eau à 0 ^{gr} ,1 par litre	3 c.c. 5
CuSO ⁴ .5H ² O à 10 pour 100	5 „
Acide chlorhydrique (D=1,050)	10 „
Eau q. s. pour	100 „

Une couche de ce mélange d'épaisseur de 20 m.m. présente l'intensité égale à celle de la couche d'épaisseur de 20 m.m. du témoin contenant 0,2 milligrammes d'acide urique.

Mélange B.

Solution de bleu à l'eau à 0 ^{gr} ,1 par litre	1 c.c. 5
SO ⁴ Cu.5H ² O à 10 pour 100	4 „
Acide chlorhydrique (D=1,050)	10 „
Eau q. s. pour	100 „

La coloration du témoin contenant 0,1 milligramme d'acide urique est très pâle. À cet effet, il est préférable que l'on fasse les lectures à 40 m.m. environ de l'échelle. L'intensité de la teinte du mélange B correspond à celle du témoin à l'acide urique, en proportion de 40 à 40,5.

III. Dosage de l'adrénaline par le procédé de Folin, Cannon et Denis¹⁾.

Folin, Cannon et Denis ont démontré qu'une solution d'adrénaline, en la traitant de la même manière que l'acide urique comme il a été décrit dans le chapitre précédent, produit la même coloration que ce dernier. Partant de ce fait, ils ont créé une méthode colorimétrique sensible pour la détermination de l'adrénaline, dont l'étalon est tout-à-fait le même que celui de l'acide urique.

A priori, on peut appliquer le témoin au bleu à l'eau pour le dosage de l'acide urique et aussi pour celui de l'adrénaline.

1) C. Folin, W. B. Cannon et W. Denis, Jl. of Biol. Chem., 13 (1912), 477.

IV. Dosage de l'acétone par le procédé de Csonka.¹⁾

Par addition d'aldehyde salicylique, en milieu rendu alcalin par la soude caustique, une dissolution d'acétone devient d'un rouge jaunâtre, plus ou moins foncé suivant la concentration d'acétone dissoute. Grâce à cette réaction colorante, on peut faire une détermination colorimétrique d'acétone. Ce qui constitue le principe du procédé crée par Csonka. La solution témoin de ce procédé est telle qu'elle renferme un milligramme d'acétone par 2 c.c. Cette dernière solution doit être fraîche, car si elle reste longtemps, elle s'altère, l'acétone se condense²⁾; bien plus, la manière de l'obtenir demande un procédé très compliqué.

Une inspection attentive de la couleur, provoquée dans la solution d'acétone en la traitant comme précédemment, m'a permis de rappeler la présence d'une substance qui a une coloration comparable à celle de la première. C'est le bichromate de potassium, sel employé à divers buts, tout particulièrement, il sert, comme on le sait, pour la méthode colorimétrique de Folin à déterminer la créatinine. Il m'a donc paru qu'à l'aide de ce corps un dosage colorimétrique d'acétone pourra aussi être établi.

Le problème consiste maintenant à savoir les conditions, dans lesquelles on doit l'appliquer au dosage d'acétone.

Pour ce qui concerne la concentration, j'ai adopté la même que pour la créatinine. Parce que non seulement l'intensité de la teinte de la solution de Folin est à peu près égale à celle de la solution d'acétone de Csonka, mais encore, c'est très pratique parce qu'on peut employer un seul liquide pour l'usage de plusieurs procédés.

D'après l'indication de Csonka, on prend comme le type de la teinte celle d'une couche d'épaisseur de 15 m.m. de la solution étalon. Mais, il vaudrait mieux, une épaisseur plus faible; elle permet une observation plus exacte. Plusieurs essais de contrôle m'ont confirmé que, ce qu'on peut constater avec exactitude des différences jusqu'au dixième de millimètre, n'est possible seulement que par les lectures comprises entre 5 et 10 m.m. En conséquence, je me suis servi, avec l'échantillon du bichromate, d'une couche d'épaisseur réglée de 8 m.m. correspondant à 10 m.m. de la solution étalon après Csonka.

1) F. A. Csonka, *Jl. of Biol. Chem.*, **27** (1916), 209.

2) W. M. Marrott, *Jl. of Biol. Chem.*, **16** (1913), 281. F. A. Csonka, *l.c.*

Alors, dans le but de vérifier l'applicabilité du bichromate, j'ai entrepris une étude comparative de la méthode colorimétrique, en me servant du sel, et de la méthode de Messinger¹⁾. Comme on peut le voir au tableau II, la concordance entre les chiffres trouvés par les deux méthodes est assez suffisante. Comme Csonka déjà l'observait, les données colorimétriques sont toutefois un peu inférieures aux données obtenues par la méthode de Messinger, particulièrement s'il s'agit d'une plus grande quantité d'acétone. Il n'infirme néanmoins en rien la valeur de mon témoin.

TABLEAU II.

Numéro des Solutions d'acétone	Taux d'acétone trouvé par la méthode colorimétrique au bichromate p. 100	Taux d'acétone trouvé par la méthode de Messinger p. 100
1	0,0413	0,0438
	0,0413	0,0438
2	0,0069	0,0070
	0,0069	0,0070
3	0,0036	0,0036
	0,0036	0,0036

Cette expérience démontre d'une manière très évidente que la solution deminormale du bichromate de potassium est un témoin excellent pour le procédé de Csonka, l'usage duquel resout parfaitement la difficulté, à laquelle on se heurtera pour la préparation du témoin.

V. Dosage de la cholestérine au moyen de la réaction de Liebermann-Burchard.

Pour déterminer colorimétriquement la cholestérine, il faut que l'extraction précède toujours le dosage proprement dit. Pour l'extraction, chaque auteur a son procédé. Quant au dernier, est il aussi un sujet de variations assez abondantes.

Or donc, pour déterminer colorimétriquement la cholestérine, on peut avoir recours, parmi les nombreuses réactions colorantes, à celle de Liebermann-Burchard, celle de Salkowski ou celle de Tschugaïeff. Les procédés de Grigaut²⁾, d'Autenrieth et

1) J. Messinger, *Berichte d. deutsch. chem. Geselsch.*, **21** (1888), 3366.

2) A. Grigaut, *Compt. rend. de la Société de Biologie*, **68** (1910), 791; **71** (1911), 513.

Funk¹⁾, de Bloor²⁾ et des autres reposent sur la première réaction ; le procédé de Weston³⁾ sur la seconde ; et le procédé d'Iscovesco⁴⁾ sur la dernière réaction.

En somme, nous avons actuellement un grand nombre du procédé pour déterminer la cholestérine. C'est pendant ces dernières années qu'il y a une vive dispute sur la valeur des différentes méthodes et sur tout sur la méthode de l'extraction. Quant à la réaction sur laquelle le dosage est basé, la plupart des savants donne cependant la préférence à la réaction de Liebermann-Burchard. Mais, ils ne s'accordent pas encors de la durée ou de la température de réaction, de la teneur en cholestérine de la solution témoin, ou de la quantité d'acide à ajouter pour faire apparaître la couleur.

Quelque soit la manière de la faire produire, la couleur bleue formée pâlit toujours assez vite. À cet effet, on emploie quelquefois comme témoin une solution de vert de naphthol B,⁵⁾ ou un mélange de naphthol B et de bleu de méthylène⁶⁾. Mais, il ne mérite pas d'être préféré, parcequ'il tire trop sur le jaune.

Or, une solution de sulfate de cuivre est un témoin excellent. Sa solution est bleue, mais, par addition peu à peu de chlorure de sodium la nuance passe graduellement au vert. Ainsi on arrive enfin à obtenir une liqueur bien verte qui peut servir supérieurement comme terme de comparaison.

L'intensité de la couleur du témoin à la cholestérine est naturellement différente, selon le procédé de la préparation. En variant la quantité de sulfate de cuivre ou de chlorure de sodium, on peut aisément reproduire cette différence. De cette manière on peut obtenir le témoin désiré par quelque auteur que se soit.

Voici la composition du témoin pour le procédé de Bloor.

SO ⁴ Cu.5H ² O à 20 pour 100	10 c.c.
NaCl à 30 pour 100	22 „

1) W. Autenrieth et A. Funk, Münch. med. Woch., **60**, i (1913), 1248.

2) W. R. Bloor, Jl. of Biol. Chem., **24** (1916), 227 ; **29** (1917), 437.

3) P. G. Weston, Jl. of Med. Research, **26** (1912), 47 ; P. G. Weston et G. H. Kent, ibid., 531 ; P. G. Weston, Jl. of Biol. Chem., **28** (1916), 383.

4) H. Iscovesco, compt. rend. de la Société de Biologie, **72** (1912), 318.

5) F. G. Gorham et V. C. Myers, Archives of Int. Med., **20** (1917), 599, en dissolution à 0.0118 p. c. ; V. C. Myers et E. L. Wardell, Jl. of Biol. Chem., **36** (1918), 147, en dissolution à 0.005 p. c.

6) G. Luden, Chem. Abstract, **13** (1919), 3233.

Suivant les rapports de Bloor, pour préparer la solution témoin, on procède de la manière suivante :

Verser 5 c.c. d'une solution chloroformique contenant 0^{mgr},5 de cholestérine pure, dans une éprouvette graduée et bouchée à l'émerie de 10 c.c., ajouter 2 c.c. d'anhydride acétique et 0^{cc},1 d'acide sulfurique concentré, mélanger en retournant l'éprouvette plusieurs fois sur elle-même et puis laisser reposer dans un lieu obscur à 22°; au bout de 15 minutes, l'éprouvette prend une belle couleur verte. L'échantillon à analyser est traité simultanément. On n'a plus qu'à les comparer au colorimètre.

TABLEAU III.

Coloration du témoin de Bloor, comparé à celui à sulfate de cuivre, en temps divers.

Numéro des expériences	Temps en minutes après avoir été introduit dans le cube	Longueur de la couche du témoin au sulfate en millimètres qui donne l'égalité d'intensité avec une couche d'épaisseur de 15 m.m. longue, du témoin de Bloor	Différence de la nuance, en la comparant à celle du témoin au sulfate
1	immédiatement	12,5	un peu plus bleue presque égale égale
	3	13,2	
	5	12,0	
	10	"	"
	15	10,8	jaunâtre
	25	9,2	jaune
2	immédiatement	12,5	plus bleue
	4	12,0	égale
	5	"	"
	10	"	"
	15	10,8	jaunâtre
3	immédiatement	12,5	plus bleue
	3	12,0	égale
	5	"	"
	6	"	"
	9	11,0	jaunâtre
4	2	12,0	un peu plus bleue
	3	"	égale
	6	"	"
	7	"	un peu jaunâtre
	9	"	jaunâtre

J'ai préparé, suivant les indications de Bloor, d'abord, comme usuel plusieurs fois le témoin, dont la nuance et le caractère ont été examinés soigneusement; en peu de temps, il m'a été démontré, qu'il n'est pas indifférent de faire la lecture au temps arbitraire; mais, au contraire, la couleur change et pâlit successivement, encore après avoir été introduite dans le cube du colorimètre. Cette alteration s'avance

plus vite au commencement, jusqu'à 3 à 4 minutes; et ensuite sa vitesse diminue beaucoup, et ne varie presque pas de couleur pendant 3 à 4 minutes; alors il commence de nouveau à pâlir appréciablement, comme on le voit au tableau III.

Il est donc nécessaire, que, dans le procédé de Bloor, on fasse la comparaison toujours entre 4 et 6 minutes après avoir sorti de l'obscurité, c'est-à-dire au temps même dans lequel le changement visible de la couleur s'interrompt; autrement, on obtiendrait qu'un résultat maldéfini.

Le mélange indiqué plus haut est tel que, observé à 15–20°, sous l'épaisseur de 12 m.m., donne égalité d'intensité avec une couche d'épaisseur 15 m.m. du témoin préparé d'après Bloor et observé dans les conditions précédentes.

Les résultats des déterminations colorimétriques, faites sur des solutions titrées de cholestérine, au nouveau témoin, démontrent évidemment l'applicabilité du sulfate de cuivre.

En voici les chiffres obtenus.

TABLEAU IV.

Numéro des solutions	Poid de cholestérine en milligramme, contenue dans 5 c.c. de la solution	
	Trouvé	Calculé
1	0,153	0,150
2	0,244	0,250
3	0,347	0,350
4	0,500	0,500
5	0,559	0,560

VI. Dosage de l'azote des α -amino-acides par le procédé de Harding et MacLean¹⁾.

Si à la solution de l' α -amino-acide on ajoute de la ninhydrine et puis on chauffe, comme nous le savons par la réaction d'Abderhalden, il se fait une coloration bleue caractéristique.

C'est Harding et MacLean qui ont élaboré, basant sur cette dernière réaction, une méthode, d'après laquelle l'azote aminé libre

1) V. J. Harding et R. M. MacLean, *Jl. of Biol. Chem.*, **20** (1915), 217; **24** (1916), 503.

des α -amino-acides peut être déterminé colorimétriquement. Ayant comparé leur méthode à celle de van Slyke d'une part, de Sørensen et Henriques d'autre part, ils montraient que la méthode colorimétrique est la plus simple et la plus sensible de toutes, cependant, en sûreté, elle est tant soit peu inférieure à la méthode gazométrique. En outre, les auteurs la recommandent aussi pour suivre l'hydrolyse des matières protéiques.

Mais la méthode de Harding et MacLean est entachée d'un désavantage ; c'est-à-dire, la teinte de la solution témoin tient à peine trois heures seulement. Par suite, ils se sont efforés eux-mêmes, mais en vain, de trouver une solution témoin permanente.

C'est ainsi que j'ai étudié le même objet, et j'ai pu arriver à un résultat satisfaisant, en me servant d'un mélange d'indigo et de safranine, ou, encore mieux, d'un mélange de bleu à l'eau et de safranine.

Parlons d'abord du premier.

Pour cela on commence par préparer les liqueurs suivantes :

A. *Solution de l'indigotine.*

On l'obtient de la manière suivante :

Aux 0^{gr},005 de l'indigotine de Kahlbaum, desséché dans un dessiccateur et pesé avec exactitude, on ajoute 5 c.c. d'acide sulfurique pur et concentré, on chauffe au bain marie bouillant pendant 3 min., jusqu'à la dissolution complète d'indigotine ; après refroidissement, on verse dans 200 c.c. environ d'eau ; et puis, on amène le volume à 500 c.c. dans un matras jaugé. Comme plusieurs essais de contrôle me l'ont démontré, on peut toujours obtenir une liqueur à teinte égale, si l'on effectue la préparation avec tout les soins nécessaires.

B. *Solution de la safranine.*

Une dissolution de la safranine de Merck, Darmstadt, qui en renferme exactement 0^{gr},01 dans un litre.

Un mélange des solutions précédentes en parties de 50 (A) et 20 (B), donne un effet d'optique égale au témoin à l'alanine préparé d'après Harding et MacLean. Alors, ce mélange nous offre un liquide témoin pour le dosage colorimétrique des acides aminés.

Les comparaisons répétées, au moyen du colorimètre de Duboscq, de l'intensité de la coloration entre les témoins des deux sources ont donné les résultats uniques.

La couche du témoin à l'indigotine d'épaisseur de 14,5, 18,5 et 23 m.m., donne l'égalité de la teinte de celle du témoin à l'alanine d'épaisseur de 15, 20 et 25 m.m.

Il est donc préférable, dans la comparaison, de déterminer l'épaisseur de la couche du témoin à l'indigo à 18^{mm},5 donnant une teinte égale à celle du témoin de Harding et MacLean qui renferme 0^{gr},005 d'azote aminé dans 100 c.c., observé sous l'épaisseur de 20 m.m.

Ensuite quelques déterminations colorimétriques ont été faites en suivant exactement les indications de Harding et MacLean, sauf la nature de la solution témoin, sur une solution titre connue d'alanine.

0^{gr},0335 d'alanine pure ont été dissoutes, dans 100 c.c. d'eau ; en 1 c.c., soumise au dosage colorimétrique, a donné 0,0052 p. 100 N correspondant à 0,0333 p. 100 d'alanine.

Meilleure solution témoin que l'on prépare en faisant un mélange de la composition suivante :

Solution de bleu à l'eau à 0,2 pour 1000	10 c.c.
Solution de safranine à 0,01 pour 1000	30 „
Acide chlorhydrique à 1 pour 100	10 „
Eau distillée q. s. pour	200 „

Ce mélange qui présente une coloration identique à celle de la réaction de ninhydrine, comparé au colorimètre avec la solution témoin à l'alanine, donne les valeurs qui suivent.

L'intensité de la coloration du mélange, observée sous l'épaisseur de 14, 18 et 32,4 m.m., est égale à celle du témoin préparé d'après Harding et MacLean, observée sous l'épaisseur de 15, 20 et 25 m.m.

Alors, on procède le dosage colorimétrique, en observant le témoin au mélange toujours sous l'épaisseur de 18 m.m., correspondant à 20 m.m. du témoin à l'alanine d'après Harding et MacLean.

Pour faire l'épreuve d'applicabilité de ce mélange, j'ai fait quelques déterminations colorimétriques avec celui-ci comme le témoin sur les solutions connues des acides aminés. Les résultats ont m'indiqué évidemment son applicabilité, affirmant en même temps, que la méthode colorimétrique de Harding et MacLean nous fournit un moyen pratique de déterminer l'azote aminé des α -mino-acides.

1 c.c. d'une solution d'alanine pure, Kahlbaum, qui en renferme exactement 0^{gr},1589 dans 500 c.c. a été prélevée et traitée par la nin-

hydrine, suivant les indications de Harding et MacLean.

La nuance et l'intensité de la couleur produite, ont été entièrement égale à celles du témoin préparé avec bleu à l'eau, en l'examinant sous l'épaisseur de 20 resp. 18 m.m. au colorimètre. Si l'on a fait varier, par dixièmes de millimètre, l'épaisseur de la couche de l'une des solutions, il en est résulté une différence notable d'intensité entre elles. L'expérience qui a été répétée quatre fois a fourni des résultats identiques.

Ensuite, 0^{gr},1589 de phénylalanine pure, Kahlbaum, ont été dissoutes dans l'eau distillé de manière à avoir en tout 250 c.c. de la solution. Les dosages colorimétriques pratiqués sur des échantillons pris d'essais de 1 c.c. de cette solution ont donné des résultats satisfaisants. Tableau V contient les résultats.

TABLEAU V.

Numéro des expériences	Poid de phénylalanine en milligramme	
	Trouvé	Calculé
1	0,048	0,054
2	0,047	0,054

Comme nous l'avons dit, nous pouvons faire usage de l'un de deux mélanges à volonté. Mais, la solution de bleu à l'eau est préférable, parceque c'est elle qui se prépare le plus facilement et qui est plus stable que la solution d'indigotine.

VII. Dosage du glucose dans le sang par le procédé de Folin et Wu¹⁾.

Une nouvelle méthode à doser le glucose dans le sang a été proposé récemment par Folin et Wu¹⁾. Plus tard Höst et Hatlehol²⁾ ont étudié, comparativement, cette méthode ainsi que les autres. Cette méthode consiste, dans ses grands lignes, à ajouter au sang séparé du précipité par acide tungstique, une solution alcaline de tartarate de cuivre, chauffer et ajouter le réactif de phénol; après refroidissement, on y ajoute une solution saturée de carbonate de sodium, il résulte une coloration bleue foncée que l'on compare au colorimètre.

1) O. Folin et H. Wu, JI. of Biol. Chem., **38** (1919), 106.

2) H. F. Höst et Hatlehol, *ibid*, **42** (1920), 347.

Cette coloration, à ma connaissance, change par degrés de teinte. Par suite, j'ai élaboré un témoin permanent aussi pour cela.

Voici le témoin que je veux recommander.

Solution de bleu à l'eau à 0 ^{gr} ,01 par litre	50 c.c.
„ „ nigrosine „ „ 2 „ „	12 „
„ „ SO ⁴ Cu.5H ² O 5 à 10 pour 100	10 „
Acide chlorhydrique à pour 100	2 „
Eau distillée q. s. pour	100 „

La nigrosine est additionné dans le but d'imiter la teinte bleue sombre de la couleur du témoin préparé suivant les indications de Folin et Wu.

Par plusieurs expériences il a été constaté qu'une couche d'épaisseur de 14^{mm},5 de la solution décrite ci-dessus présente une intensité de la couleur précisément identique à celle de la couche d'épaisseur de 15 m.m. du témoin préparé d'après Folin et Wu.
