

Nous pensons que la méthode exposée pourra rendre des services utiles toutes les fois que la prise d'essai du produit biologique à analyser ne permettra pas l'application des méthodes couramment appliquées.

LE DOSAGE ÉLECTROPHOTOMÉTRIQUE DES VITAMINES B₁ ET B₂ DU LAIT SANS ADSORPTION PRÉALABLE (1)

par

Mlle ANDRÉE VINET et M. PAUL MEUNIER

Après élimination du beurre, de la caséine, des phosphates et du lactose, on obtient, sans adsorption, un extrait de lait dans lequel on peut doser la vitamine B₁ par son azo-réaction effectuée avec et sans ferricyanure (méthode Meunier-Blancpain [1]) et la vitamine B₂ par colorimétrie directe.

Les faibles concentrations sous lesquelles les vitamines B₁ et B₂ se rencontrent dans la plupart des produits naturels ont obligé les biochimistes à concentrer ces vitamines par une adsorption préalable avant de procéder à leur dosage par fluorométrie. Les difficultés techniques de cette méthode d'isolement, d'une part, et des mesures de lumière de fluorescence, d'autre part, sont bien connues.

Nous voulons montrer par suite de quelles circonstances favorables le dosage des vitamines B₁ et B₂ est possible dans le lait sans adsorption préalable et par l'emploi de l'électrophotomètre.

Après plusieurs essais, nous avons choisi le mode d'extraction suivant : la caséine et les matières grasses sont éliminées par l'acide acétique à 2%. le résidu, évaporé à sec sous vide est extrait par l'alcool méthylique qui insolubilise les phosphates et le lactose et entraîne la totalité des vitamines B₁ et B₂. Dans l'extrait final, la vitamine B₁ est le seul corps diazotable et la vitamine B₂ le seul pigment mesurable avec l'écran bleu de l'appareil.

Technique

1° Extraction. — Placer au bain-marie bouillant à reflux 100 cm³ de lait et 100 cm³ d'acide acétique à 2%. Laisser une demi-heure.

Filtrer sur filtre de Buchner et rincer le filtre à l'aide de 20 cm³ d'acide acétique à 2%.

Ajouter ensuite 100 cm³ d'alcool absolu et abandonner deux heures. Filtrer à nouveau. Evaporer le filtrat sous vide jusqu'à

(1) *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, t. XXII, septembre-décembre 1940, p. 556-558. Mémoire présenté à la séance du 15 octobre 1940.

résidu sec. Traiter le résidu par 100 cm³ d'alcool méthylique et laisser deux heures en contact.

4. Filtrer et évaporer à nouveau le filtrat sous vide. Dissoudre finalement le résidu dans 10 cm³ d'eau distillée et filtrer.

2° Dosage de la vitamine B₂. — Verser dans une cuve de 10 mm. la liqueur d'extraction précédente. En déterminer l'absorption dans l'écran bleu et l'écran orangé de l'électrophotomètre (1).

Cette dernière valeur ne doit pas dépasser sensiblement le chiffre d'absorption de l'eau distillée.

Le produit de la différence entre les absorptions de l'extrait et de l'eau distillée dans le bleu multiplié par 1,92 (valeur d'une division de l'électrophotomètre en lactoflavine) mesure en gamma la quantité de lactoflavine contenue dans 100 cm³ de lait.

3° Dosage de la vitamine B₁.

Solutions nécessaires :

A) Solution alcaline :

Bicarbonate de sodium	2,6 g.
Hydroxyde de sodium N/2	100 cm ³

B) Solution de nitrite de sodium à 5% dans l'eau.

C) Avant chaque série de mesures, mélanger 6 volumes de B à 100 volumes de A.

D) Solution d'acide sulfanilique à 1% dans l'acide chlorhydrique à 10%.

E) Solution fraîche (moins de 8 jours) de ferricyanure de potassium à 2% dans l'eau.

Dans la cuve de 10 mm. d'épaisseur, verser deux gouttes de la solution D puis 4 cm³ du mélange C. Agiter légèrement la cuve.

Verser à un moment bien déterminé 1 cm³ de la liqueur d'extraction précédente. Agiter la cuve par retournement.

Faire les lectures colorimétriques dans l'écran vert de 30 en 30 secondes jusqu'à 2 minutes.

Répéter l'expérience en ajoutant dans la cuve une goutte de ferricyanure avant l'addition de l'extrait à titrer.

Tracer les deux courbes cinétiques ainsi obtenues. Evaluer la quantité de vitamine B₁ de la prise d'essai en multipliant la différence des ordonnées des deux courbes à 1 minute et demie ou 2 minutes par 0,81 gamma (valeur d'une division de l'électrophotomètre en chlorhydrate d'aneurine).

(1) Electrophotomètre Meunier, Jobin et Yvon, constructeurs à Arcueil (Seine).

Résultats obtenus

Echantillons	B ₁ en mg. de Chl. par litre	B ₂ en mg. par litre
Lait M. nature, hiver	0,72	0,82
Lait O. nature, hiver	0,81	1,10
— homogénéisé	1,00	0,85
— stabilisé (2 jours)	0,97	1,10
— — (3 jours)	1,05	0,90
— — (6 jours)	1,01	1,20
— — (20 jours)	0,81	1,30
— — (1 mois)	0,90	1,40
— — (2 mois)	0,36	1,20

Conclusions

Pour la vitamine B₂, nos résultats sont en accord avec les chiffres obtenus par voie biologique (1 mg. par litre en moyenne) [2]. Nous n'avons constaté aucune perte au cours de l'homogénéisation, de la stérilisation rapide (stabilisation) ou de la conservation du lait.

En ce qui concerne la vitamine B₁, nous sommes en général un peu avantagés sur les résultats antérieurs [3]. Pour l'aneurine, nous ne constatons pas non plus de perte sensible au cours de la stabilisation du lait comme Kay [4] l'a observé au cours de la pasteurisation. Enfin, cette teneur se maintient après deux mois de conservation. Ce fait a d'ailleurs déjà été exposé par M. JAVILLIER [5].

Au point de vue analytique, nous voudrions insister sur le fait que la méthode de dosage à l'azo-réaction et au ferricyanure doit être soigneusement contrôlée à chaque extension de son application. Dans le cas du lait, nous avons tenu à évaluer par fluorescence les quantité de thiochrome que nous produisons dans la seconde phase de notre technique.

(Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences,
96, boulevard Raspail. Professeur : M. M. JAVILLIER.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MEUNIER (P.) et BLANCPAIN (Cl.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 649.
- [2] RAFFY (Mlle A.). *Bull. Soc. Hyg. Alim.*, 1939, **27**, 1 et 2.
- [3] WILLIAMS et SPIES. *Vitamine B₁ and its use in Medicine*. 1 vol. New-York, 1938, 237.
- [4] KAY (H. D.). *Nutrition Abs. Rev.*, 1939, **9**, 1.
- [5] JAVILLIER (M. M.). *C. R. Ac. Agric.*, 1940, **26**, 369.