NOUVEAU PROCÉDÉ PRATIQUE POUR LE DOSAGE DE LA PEPSINE.

Par

MAKI TAKATA.

(高田 時)

(Du laboratoire de chimie médicale, dirigé par
Prof. Katsuji Inouye.)

Il y a deux catégories du procédé à déterminer la force d'une liqueur à la pepsine : 1° par la détermination de la quantité de matière albuminoïde dissoute ou de la rapidité de l'action dissolvante, 2° par le dosage de la quantité de peptones et d'albumoses formées. Dans le cas d'expériences où il n'y a pas besoin d'une grande exactitude, on se sert souvent du premier procédé, comme il convient de le faire. Le procédé de Mett, celui de Grützner, et celui de Roaf qui appartiennent à cette dernière catégorie.

D'après la méthode de Grützner¹⁾, on fait digérer de la fibrine teinte par de la carmine pendant un temps donné pris pour unité, avec le suc gastrique à examiner ; puis on compare la coloration du liquide à celle d'un témoin.

Cette méthode ne peut pas être adoptée pour la trypsine. En vue d'exclure ce désavantage, Roaf²⁾ a proposé une nouvelle méthode. Elle diffère surtout par l'emploi du rouge Congo.

Mais, en général, il est plus difficile de distinguer avec exactitude la petite différence d'intensité entre des colorations bleues qui se forment dans le procédé de Roaf, qu'à évaluer l'intensité de la coloration rouge. L'emploi de ce nouveau corps là ne fournit pas un grand progrès de la technique pour doser la pepsine.

1) P. v. Grützner, Arch. f. ges. Physiol., 8 (1874), 452 ; 144 (1912), 545.

2) H. E. Roaf, Biochem. J., 3 (1908), 188.

D'ailleurs, les deux méthodes ont un défaut grave commun ; c'est-à-dire, les matières colorantes se précipitent dans un milieu acide, ce qui doit beaucoup influencer sur les résultats d'expériences.

À cet effet, on emploie rarement un procédé colorimétrique pour le dosage du ferment, quoiqu'elle soit très simple et qu'on puisse l'accomplir dans un temps court.

Dans une autre expérience, j'ai trouvé que, par l'application de la fuchsine S, l'on peut libérer le procédé colorimétrique de ce défauts.

Weber¹⁾, Winogradow²⁾ et Houghton³⁾ ont remarqué que la pepsine, en présence des certaines matières colorantes, à des doses suffisantes, perd plus ou moins de ses propriétés digestives. D'après Hugounenq⁴⁾, la fuchsine est un agent paralysant très énergique.

Mais, Gudeman⁵⁾ qui a minutieusement repris l'étude sur les effets des matières colorantes sur la pepsine, a observé que la fuchsine, à des doses inférieures à 1 à 10, n'agit pas pour retarder son pouvoir diastasique. Par contre, le rouge Congo que Roaf a recommandé, doit exercer une action fâcheuse des plus marquées.

J'ai donc entrepris les expériences de comparaison de l'influence de la carmine, du rouge Congo et de la fuchsine S sur la digestion pepsique.

Dans quatre vases contenant chacun 10 c.c. du suc gastrique tiré du petit estomach d'un chien, et qui est préalablement dix fois dilué, 1 gramme de fibrine était introduit de la façon suivantes : dans l'une de la fibrine carminée de Grützner, dans le second de la fibrine teinte après Roaf, dans le troisième de la fibrine fuchsinée décrite ci-dessous, et dans le quatrième de la fibrine non-colorée qui était préalablement traitée par l'acide chlorhydrique et desséchée. Toutes les sortes de fibrine ont été prises après avoir été séchée dans un dessiccateur et pesées exactement autant que possible. Puis le tout était placé dans une étuve à 38°. Après deux heures de digestion, les vases étaient rapidement refroidis, en les plongeant dans la glace, et le contenu était versé dans un tube à centrifuger taré, en détachant et entraînant à l'aide de la baguette de verre le reste indissout de fibrine. Après la centrifugation, le liquide surnageant était séparé par décantation du dépôt de

1) H. A. Weber, *Jl. of Am. Chem. Soc.*, **18** (1896), 1092.

2) A. I. Winogradow, *Biochem. Centralbl.*, **1** (1903), 232.

3) H. W. Houghton, *Jl. of Am. Chem. Soc.*, **29** (1907), 1351.

4) L. Hugounenq, *Précis de Chimie Physiologique et Pathologique*, Paris 1912, 124.

5) E. Gudeman, *Jl. of Am. Chem. Soc.*, **27** (1905), 1436.

fibrine qu'on lavait successivement à l'eau distillée, à l'alcool étendu, à l'alcool absolu, et puis à l'éther, toujours par centrifugation. Les précipités étaient alors desséchés et pesés, et leur poids devaient indiquer la relation de proportionalité inverse du pouvoir diastasique.

Les résultats consignés dans le tableau suivant montrent que la fuchsine S exerce une action fâcheuse la plus petite.

TABLEAU I.

	Poids de fibrine restant indissoute.		
	1°	2°	3°
Fibrine non-colorée	0,027	0,105	0,096
Fibrine de Grützner	0,410	0,298	0,260
Fibrine de Roaf	0,430	0,311	0,384
Fibrine de Takata	0,183	0,210	0,148

PRÉPARATION DE LA FIBRINE FUCHSINÉE.

Pour la coloration on met de la fibrine découpée, pendant vingt heures environ, dans une dissolution de fuchsine S à 5 pour 100. Après vingt heures on passe à travers un linge fin. Le résidu est soumis à un lavage répété à l'eau chaude jusqu'à ce que le liquide ne soit plus coloré. On traite alors quelques temps la fibrine colorée par l'acide chlorhydrique à 0,5 pour 100, puis on la lave à l'eau distillée jusqu'à élimination du chlore. Après avoir été séparé de l'eau adhérente par la pression, la fibrine colorée est prête à l'emploi. Ou bien, on peut la conserver dans la glycérine.

MODE OPÉRATOIRE D'UNE DÉTERMINATION.

Le dosage s'effectue de la même manière que celle du procédé de Grützner. Dans un suc gastrique à essayer, on introduit un gramme de la fibrine fuchsinée et on laisse séjourner pendant 30 à 45 minutes dans une étuve à 38°. On refroidit alors rapidement avec la glace, on introduit le liquide dans un tube à centrifuger et on le tourne bien. Après la centrifugation, on introduit le liquide coloré surnageant dans le godet d'un colorimètre et on compare sa teinte au témoin. On peut prendre comme terme de comparaison soit liquide à ferment titré, soit une dissolution étendue de fuchsine S.

VÉRIFICATION DE L'APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE.

1. Dans une première série de ces expériences, plusieurs dilutions d'un suc gastrique obtenu par le procédé de petit estomac, ont été faites

et dans chacune de ces dilutions il a été introduit un même poids de fibrine fuchsinée. Au bout de quarante minutes de digestion à 38°, l'activité solubilisante des dilutions a été déterminée, en examinant la coloration du liquide au colorimètre de Duboscq. Le tableau suivant résume les expériences.

TABLEAU II.

Numéro des expériences.	Suc gastrique, préalablement dix fois dilué. c.c.	Acide chlorhydrique à 0,5 p. 100. c.c.	Fibrine fuchsinée. gramme	Proportion de poids dissout.	
				trouvé	calculé
1	1	8	1	1	1
	4	5	1	2	2
	9	0	1	3	3
2	2	8	1	1,4	1,3
	5	5	1	2,2	2,2
	8	2	1	2,8	2,9

Ce tableau montre que la quantité de la fibrine dissoute est proportionnelle à la racine carrée de la concentration de la solution de pepsine.

2. La deuxième série d'expériences a été conduite de la façon suivante: Un gramme de fibrine fuchsinée a été versé dans chacun des quatre tubes à essais contenant 5 c.c. d'un suc gastrique dilué dix fois. Les tubes ont été exposés à 38°, pendant un temps variable, allant de 16 minutes à 100 minutes. Au bout du temps fixé, l'action de la pepsine a été terminée et les quantités de la fibrine dissoute ont été colorimétriquement déterminées.

Voici les données des expériences.

TABLEAU III.

Durée de digestion en minutes.	Suc gastrique, préalablement dix fois dilué. c.c.	Acide chlorhydrique à 0,5 p. 100. c.c.	Fibrine fuchsinée. gramme	Proportion de poids dissout.	$x:\sqrt{t}$
16	5	5	1	5	1,25
36	5	5	1	10,5	1,76
64	5	5	1	13,1	1,64
100	5	5	1	17,6	1,76

De ce tableau on voit bien que la quantité transformée est dépendante de la durée de l'action.