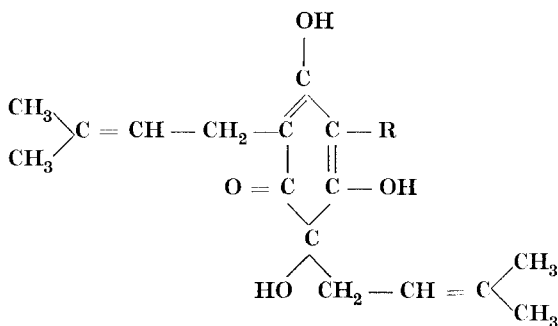


Sur la séparation du complexe « humulone » par chromatographie de partage

par

M. VERZELE (Gand) (*)

Le principe amer du houblon, de loin le plus important, est l'humulone, aussi appelée acide α (formule I, où $R = -CO-CH_2-CH(CH_3)_2$)



(I)

On l'obtient facilement à l'état brut en passant par son sel de plomb insoluble. La purification se fait par cristallisation du complexe avec l'orthophénylènediamine jusqu'à obtention du point de fusion de 117°-118°. Ce P. F. ne s'obtient que moyennant de grosses pertes en matières précipitables au plomb. Malgré cette constatation on a toujours considéré l'humulone comme un produit homogène. En effet, à la titration, l'humulate de plomb peut renfermer jusqu'à 98 % d'humulone brute.

Récemment, Rigby (1) réussit à élucider ces anomalies en

(*) Associé du F. N. R. S.

(1) F. L. RIGBY et J. L. BETHUNE, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 6118 (1952).

F. L. RIGBY et J. L. BETHUNE, *American Society of Brewing Chemists Proceedings*, Annual Meeting (1952 et 1953).

séparant l'humulone brute en trois produits différents qu'il a nommé : adhumulone (formule I, $R = -CO-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$), humulone (première formule) et cohumulone (formule I, $R = -CO-CH(CH_3)_2$). Cette séparation est effectuée par counter-current distribution, C.C.D.⁽²⁾. La cohumulone est séparée des deux autres humulones par 100 transferts environ, tandis que 300 transferts sont nécessaires dans le cas de l'adhumulone.

Comme nous avions l'intention d'étudier la séparation de ces produits par C. C. D. préparative⁽³⁾ il nous fallait une méthode d'analyse des trois humulones, nous permettant de suivre pas à pas la marche de la séparation. Une analyse pareille est possible par C. C. D. ordinaire, mais, le nombre de transferts étant assez grand comme nous venons de l'indiquer, le temps et le volume des solvants nécessaires pour obtenir le résultat désiré sont trop élevés. C'est pour les raisons énumérées ci-dessus que nous avons mis au point une méthode chromatographique permettant l'analyse des humulones de façon rapide. En résumé, le mode opératoire est le suivant.

± 10 g. de houblon sont passés deux fois dans un moulin. 2,00 g. de ce houblon moulu sont agités énergiquement avec 20 ml d'iso-octane pendant 30 min. L'extraction est totale⁽⁴⁾. On verse 1 ml de la solution claire surnageante — ce qui correspond à ± 10 mg du mélange des humulones — sur une colonne à deux phases (chromatographie de partage). La phase stationnaire est du gel de silice tamponné au phosphate à pH 9,0 le tout contenant 10 % de méthanol. La phase mobile est le 2.2.4. triméthylpentane ou « isooctane ». Lorsque la solution a été introduite dans la colonne on rince avec 1 ml d'isooctane qu'on laisse aussi pénétrer et on commence l'élution de la colonne à la vitesse de 0,5 à 0,7 ml à la minute. Dès le début du développement la colonne est protégée contre la lumière

(2) L. C. CRAIG, W. HAUSMANN, E. H. AHRENS, E. J. HARFENIST, *An. Chem.*, **23**, 1236 (1951).

(3) M. VERZELE, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **62**, 619 (1953).

M. VERZELE et F. ALDERWEIRELDT, *Nature*, **174**, 702 (1954).

(4) G. ALDERTON, G. F. BAILEY, J. C. LEWIS et F. STITT, *An. Chem.*, **26**, 983 (1954).

par du papier noir ou en la plaçant en chambre noire. Des fractions égales, de volume connu (± 5 à 7 ml) sont récoltées et la concentration ainsi que la quantité de produit dans chaque fraction sont calculées d'après l'extinction mesurée au spectrophotomètre. La longueur d'onde de mesure est de $276\text{ m}\mu$ et la valeur $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 257$ est adoptée pour l'extinction spécifique des trois humulones. Pour la séparation des trois humulones il est nécessaire d'employer une colonne de $1,3 \times 90$ cm de gel de silice et de recueillir ± 120 fractions de ± 6 ml. On peut mettre les résultats en graphique : concentration, quantité ou extinction en fonction du volume ou du numéro de la fraction sortie du tube chromatographique (Fig. 1). La quantité de chaque humulone se détermine en totalisant les quantités de chaque fraction de la bande correspondante. Les résultats obtenus par cette méthode sont tout à fait comparables aux analyses faites par C. C. D. (Rigby l. c.)

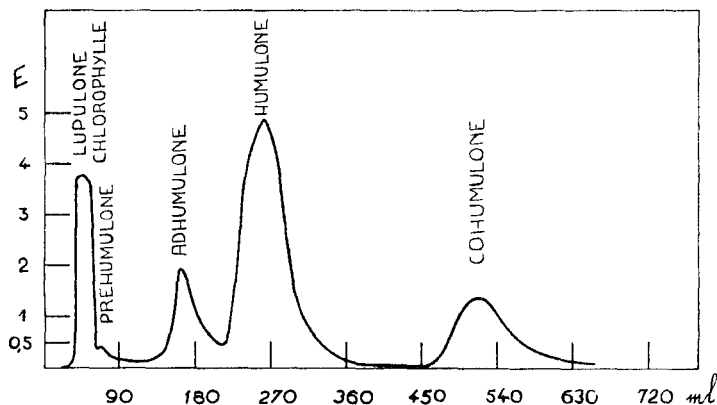


Fig. 1. Chromatographie d'un extrait de houblon (ml contre extinction)
Colonne de $1,3 \times 86$ cm.

La reproductibilité de la méthode est excellente, ainsi qu'il est montré par l'analyse suivante faite en double

1 : 14,0 % adhumulone, 40,8 % cohumulone et 45,2 % humulone
2 : 14,2 % adhumulone, 40,7 % cohumulone et 45,1 % humulone

A chaque séparation nous avons constaté la présence d'une bande de faible importance, située entre la lupulone et l'adhumulone. En prenant comme base l'extinction spécifique

de 257 on calcule pour ce produit une quantité de 1 à 5 % du total des humulones. La Fig. 2 représente le spectre U.V. d'une fraction appartenant à cette bande. Le spectre se rapproche très fort de celui de l'humulone et n'a rien à voir avec celui de la lupulone. Aussi, nous pensons avoir à faire à un quatrième constituant du complexe des humulones et nous l'appellerons provisoirement « prehumulone ».

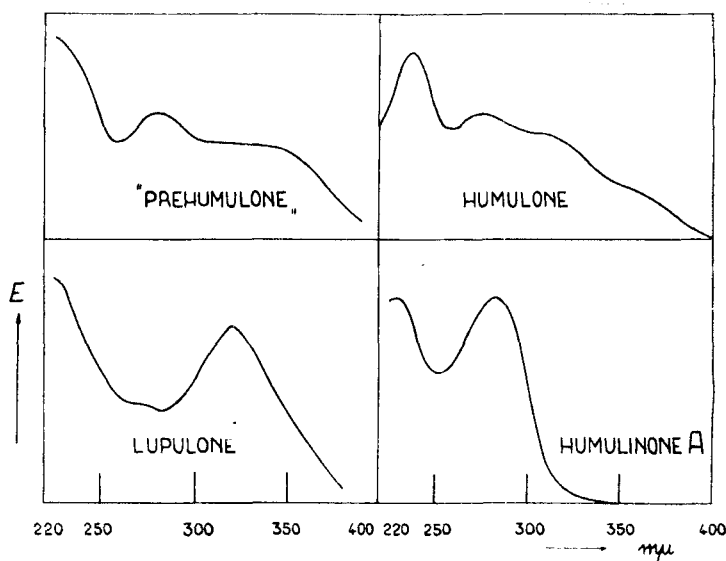


Fig. 2. Spectres U. V. (lupulone, d'après Aubert et Kringstad, humulinone, humulone et fraction d'une bande « prehumulone ») dans l'isooctane. ± 1 mg/100 ml.

Discussion de la méthode

Les facteurs déterminant la séparation (grosseur du grain et qualité du gel de silice, pH et longueur de la colonne, vitesse d'écoulement, quantité d'humulone etc.) ont été choisis de façon à donner des fractions :

- suffisamment grandes pour permettre un rinçage et le remplissage des cellules du photomètre.
- dont on peut mesurer l'extinction sans dilution.

Préparation de la colonne

A 50 g de gel de silice (préparé d'après la recette donnée

plus loin) dont le diamètre des particules est de 0,08 à 0,2 mm on ajoute 80 ml d'une solution 0,5 M de phosphate secondaire. On laisse refroidir à la t° ambiante et on mesure le pH de la suspension. Celui-ci est d'environ 7,5, le gel de silice adsorbant fortement le phosphate. On ajuste le pH à la valeur de 9,0 en ajoutant, à l'aide d'une burette, une solution de NaOH 0,3 N. Ce pH doit être exact à un dixième près. Tenant compte des 80 ml de phosphate et du volume de soude (± 25 ml) on ajoute assez de méthanol pour obtenir 10 % d'alcool dans la solution finale (11,6 ml). Cet alcool a pour but de changer le coefficient de partage au profit de la phase stationnaire. Un pH plus alcalin, donnant le même résultat est peu souhaitable étant donné la labilité de l'humulone en milieu alcalin. La suspension est versée dans un tube de $1,3 \times 100$ cm et la sédimentation du gel de silice est activée en frappant sur la colonne. L'excès de phase stationnaire est enlevé par succion au vide d'une trompe jusqu'à ce que l'écoulement de la solution tamponnée se réduit à une goutte toutes les trente secondes environ. De cette façon on obtient une colonne d'aspect homogène de $1,3 \times 85$ à 90 cm contenant ± 55 g de phase aqueuse sur les 50 g de gel de silice. On fixe ensuite sur la colonne une boule à décanter, robinet fermé, contenant de l'isooctane. Après un quart d'heure le vide est établi dans toute la colonne et on ouvre le robinet de la boule. La quantité d'isooctane trouvant place dans la colonne est d'environ 25 g. De cette façon on obtient facilement une colonne bien homogène, sans bulles d'air et dont on connaît parfaitement la composition. Nous croyons que ce procédé destiné à former des colonnes à deux phases présente des avantages sur la méthode usuelle. D'après cette dernière on ajoute 53 % de phase aqueuse au gel de silice qui est ensuite suspendu dans la phase organique et versé dans la colonne. Outre le fait qu'il est impossible de connaître exactement le pH de la phase aqueuse, la pratique démontre qu'il n'est pas facile d'obtenir ainsi des colonnes stables, homogènes et à débit constant (⁵).

(⁵) E. LEDERER et M. LEDERER, *Chromatographie*. Elsevier Publishing Company (1953) p. 71-72.

Quelques remarques générales

La fraction β du houblon (lupulone, chlorophylle et huiles essentielles) passe à travers la colonne avec la vitesse d'écoulement de l'isooctane. Un début de séparation entre la lupulone et la chlorophylle peut être observé, la chlorophylle passant tout de suite après la lupulone (Fig. 1). Après la « prehumulone » vient l'adhumulone, puis l'humulone et enfin la cohumulone. Dans les limites de 0,22 à 2,0 ml par minute, contrôlées par nous, la vitesse d'écoulement — S — n'a pratiquement pas d'influence sur l'allure du chromatogramme. L'équilibre entre les deux phases de la colonne est donc facilement établi. A chaque chromatographie successive effectuée sur la même colonne, l'élution des bandes a lieu un peu plus tôt. Ceci indique un changement dans la composition de la colonne. Ce changement peut être dû, ou bien à un abaissement du pH par adsorption de produits acides du houblon, ou bien à une diminution de la teneur en méthanol de la phase stationnaire, puisque nous éluons avec de l'iso-octane non équilibré. Pour déterminer quelle était la cause réelle, nous avons coupé en cinq morceaux une colonne sur laquelle nous avons effectué une vingtaine de chromatographies. La colonne possédait encore le pH initial sur toute sa longueur, mais la quantité d'iso-octane trouvant place dans la colonne était montée de 37 à 45 ml. Ceci revient à dire que la quantité de phase stationnaire avait baissé de 8 ml. Comme le méthanol est plus soluble que l'eau dans l'iso-octane, nous pouvons en conclure que le pourcentage en méthanol de la colonne aura baissé. De cette façon, la colonne peut devenir inutilisable après un certain nombre de chromatographies. Il est probable qu'aucun changement ne surviendrait en éluant la colonne avec de l'iso-octane équilibré. Ces remarques sur la vitesse d'écoulement et sur l'élution de plus en plus rapide, d'après le nombre de chromatographies effectuées sur la colonne, sont illustrées par la fig. 3. La 19^e chromatographie a été effectuée sur un « complexe humulone » dont l'humulone proprement dite avait été enlevée en grande partie par recristallisation du complexe avec l'o. phénylènediamine. De cette façon, les teneurs en ad- et cohumulone sont proportionnellement beaucoup plus élevées que dans le mélange initial. Sur chaque

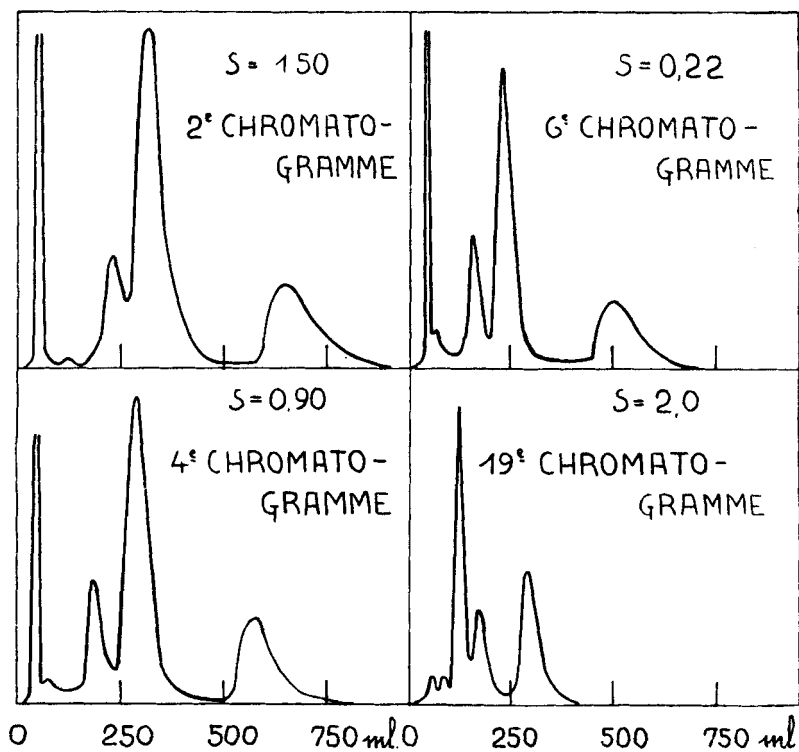


Fig. 3. Voir texte.

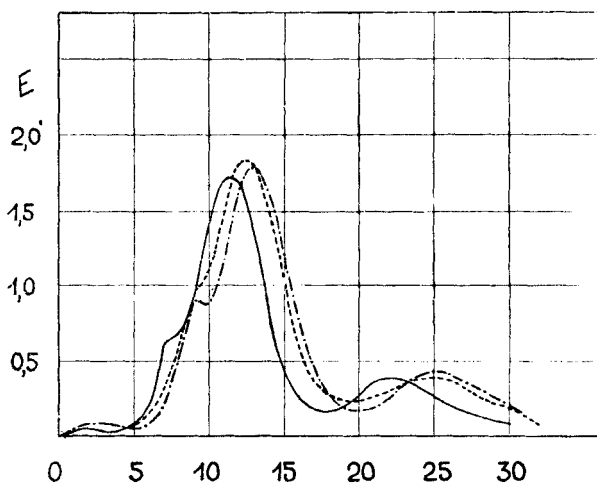


Fig. 4. Chromatographies sur colonne courte à trois mois d'intervalle

diagramme on peut constater la présence de la bande « pre-humulone ».

Les colonnes décrites ci-dessus sont donc stables et peuvent servir pendant longtemps pour un grand nombre de séparations. Ceci n'est pas le cas normalement pour une colonne à deux phases liquides. Les séparations représentées sur la Fig. 4 ont été faites sur la même colonne à trois mois d'intervalle.

Non utilisée, la colonne doit être soigneusement bouchée des deux côtés pour éviter l'évaporation des solvants. Cependant la pénétration d'un peu d'air n'a pas d'influence sur la séparation, mais à la longue la teneur en méthanol baisse et la colonne devient inutilisable.

Les phases liquides

Pour la phase stationnaire, le pH et la concentration en méthanol sont très importants. La molarité du tampon final doit être supérieure à 0,2 M. Nous avons étudié la séparation à différents pH allant de 8 à 9,5 et avec des concentrations en méthanol de 25 à 0 %. Nous croyons que les valeurs données sont les meilleures. Comme phase légère nous avons choisi l'isooctane parce qu'on peut l'obtenir à bon marché et à un degré de pureté satisfaisant pour la photométrie. La récupération de l'isooctane ne peut se faire par distillation, le produit obtenu absorbant dans l'U. V. On purifie par contre facilement l'isooctane employé pour l'analyse des humulones en le passant sur une colonne de gel de silice *sec*, celui-ci adsorbant fortement toutes les impuretés. Une colonne de 3×20 cm suffit pour la récupération d'environ 10 l d'isooctane.

Le gel de silice

La qualité du gel de silice joue un rôle important. La Fig. 5 montre deux analyses faites sur deux colonnes préparées de la même façon mais l'une avec du gel de silice fabriqué d'après la recette décrite ci-dessous, l'autre avec du gel de silice pour chromatographie acheté dans le commerce.

Pour la chromatographie d'adsorption l'activité du gel de silice, préparé d'après notre recette est comparable à celle de l'alumine. Le plus grand avantage du gel de silice est qu'on peut le régénérer indéfiniment sans perte de son activité (voir ci-dessous).

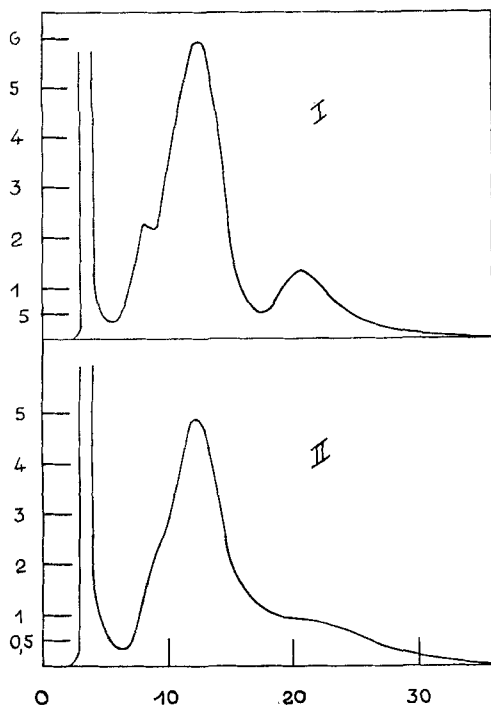


Fig. 5. Influence du gel de silice

I = notre gel de silice

II = gel du commerce.

pas 5 cm. Le gel est séché ensuite lentement et progressivement : c.à d. un jour à 50°, un jour à 60° puis à 70° et finalement un jour à 100°. Le gel est moulu dans un moulin à marteaux (tamis 1 mm) et activé par traitement avec un mélange d'acide sulfurique et nitrique (20/1) à 120-140° pendant 5 heures (*). 1 kg de gel donne une suspension que l'on peut chauffer et agiter, avec 2 kg du mélange sulfonitrique.

Le tout, après refroidissement, est versé dans 10 l d'eau, bien remué et après décantation le liquide surnageant est enlevé par siphonnage. Ce lavage du gel, recommencé 30 fois avec 10 l

3 l d'acide chlorhydrique concentré technique dilué par 7 l d'eau, d'une part, et 2,5 l de silicate de soude dilué par 7,5 l d'eau, d'autre part, sont chauffés à 40°. Ceci se fait facilement à l'aide de vapeur. On verse le *silicate* dans l'*acide* et on abandonne le mélange pendant 48 heures. Le gel est transvasé dans un récipient à double fond perforé de petits trous, permettant le lavage du gel par débordement.

Après lavage jusqu'à disparition de l'acidité, le gel essoré est étalé sur des plaques, l'épaisseur des couches ne dépassant

(*) Ce traitement permet aussi la régénération du gel, à condition de le laver au préalable au méthanol, ensuite à l'eau et enfin de le sécher avant l'opération.

d'eau agit en même temps comme une lévigation qui enlève toutes les fines poussières. Finalement le gel est séché à 160-170° pendant une nuit. L'activité du gel de silice dépend :

1. de son degré d'humidité (pour la chromatographie d'adsorption);
2. de la précipitation, qui doit se faire en milieu acide;
3. du séchage, qui doit être lent;
4. du lavage final, qui doit être suffisant.

Appareillage

Comme il faut récolter ± 120 fractions de 5-7 ml à la vitesse d'écoulement de $\pm 0,6$ ml/min, la chromatographie dure environ 16 à 17 heures. En mettant un collecteur de fractions en marche le soir on peut commencer la mesure des concentrations le lendemain matin.

La qualité du collecteur de fractions est évidemment importante. En cas d'arrêt fortuit, p. ex. de nuit, l'expérience est non seulement à refaire, mais il y a perte de temps, de produit et de solvant. Ceci nous est arrivé plusieurs fois avec un collecteur de fractions acheté dans le commerce et, ces appareils étant assez coûteux, nous en avons construit un nous-mêmes.

Le déplacement des tubes d'un collecteur peut être basé sur la mesure du volume, du temps, du poids, du nombre de gouttes, ou du niveau des fractions. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. Notre appareil devait avant tout marcher sans accroc pendant de longues périodes et devait donc être robuste et simple. Pour cette raison nous avons recherché une solution plutôt mécanique. Le principe de notre appareil (Photo n° 1) est schématisé dans la Fig. 6.

Le déplacement des tubes a lieu, après un temps déterminé par la période d'un « timer motor » (A) (p. ex. un tour/60 min) et par le nombre de cames (B) mises en service. Le nombre des cames est variable au choix (1, 2, 3, 6 et 10) et donne ainsi un déplacement toutes les 60, 30, 20, 10 ou 6 minutes. Ceci est suffisant pour la plupart des cas. Le disque portant les éprouvettes est actionné par un ressort monté sur l'axe (C) de l'appareil. Le dispositif (D) réglant le déplacement laisse passer une éprouvette à la fois. Le déplacement lui-même se fait très vite et rend le risque de perdre une goutte entre deux tubes pratiquement négligeable. Les deux rangées de 100 éprouvettes

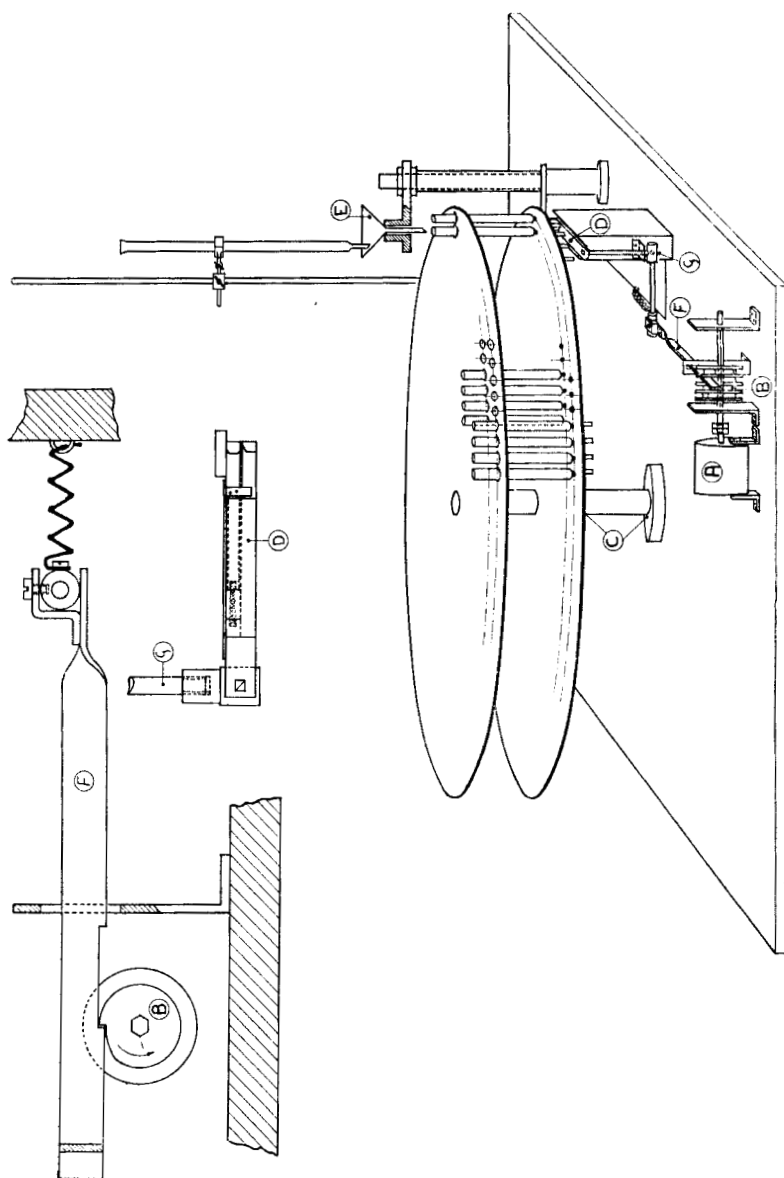


Fig. 6. Collecteur de fractions. Déplacement mécanique, déterminé par le temps, 200 tubes. Cet appareil a été conçu et construit par notre mécanicien J. Van de Weghe.

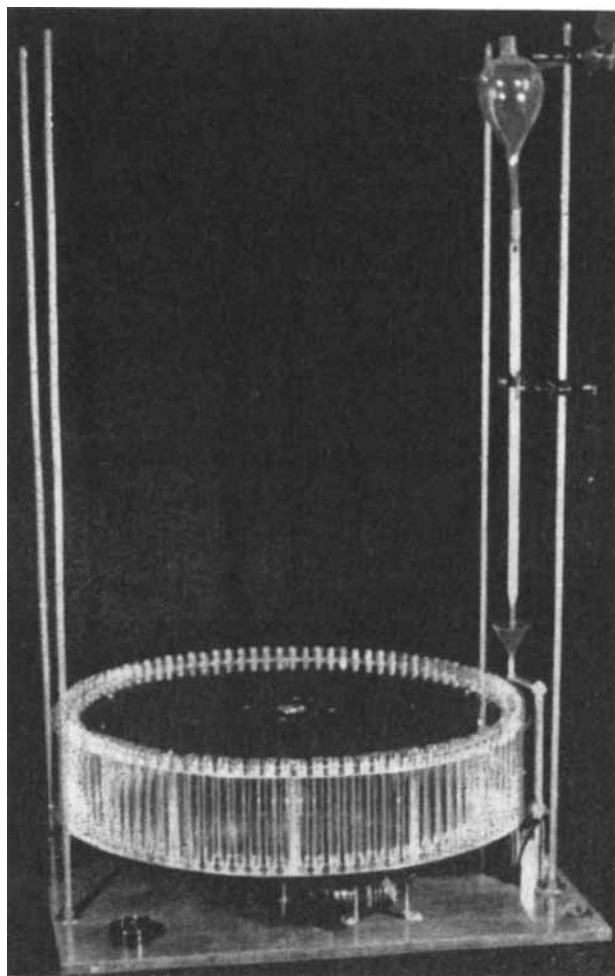


Photo n° 1

ordinaires que porte l'appareil peuvent être employés l'une à côté de l'autre (quatre fois 50 ou deux fois 100) ou bien l'une après l'autre (1×200). A raison de 60 minutes par fraction, cela nous donne la possibilité de huit jours de marche ininterrompue. On passe automatiquement d'une rangée d'éprouvettes à l'autre par le déplacement du petit entonnoir (E) après un tour complet des disques. Le déclenchement de l'ap-

pareil se fait aussi automatiquement après 100 ou 200 fractions, d'après le réglage initial.

Cet appareil possède la qualité requise de ne jamais faillir, mais on peut lui reprocher que les volumes débités ne sont pas constants, puisque le déplacement est commandé par le temps et que la vitesse d'écoulement peut varier. Ceci ne vaut cependant que pour une colonne mal préparée et non équilibrée. Avec un appareil travaillant sur le volume, les volumes seront certainement identiques. Toutefois, il n'en est ainsi qu'au moment où la fraction est débitée. Les chromatographies durant parfois plusieurs jours (voir plusieurs semaines) l'évaporation des solvants peut jouer un grand rôle et l'idéal des volumes identiques devient aléatoire, surtout lorsqu'on travaille avec des solvants volatils. Avec le chloroforme comme solvant, des pertes de 30 % en volume ont été signalées ⁽⁶⁾.

Mesure des concentrations et calculs

La quantité de produit effluant dans chaque bande est donc la somme des quantités présentes dans la totalité des fractions correspondant à une bande. L'adhumulone n'est presque jamais complètement séparée de l'humulone. Comme la teneur en adhumulone est toujours plus faible que celle de l'humulone, on prendra la fraction contenant le minimum entre les deux bandes avec la bande de l'adhumulone. La délimitation des bandes est donnée sur la Fig. 1. Pour le calcul de la quantité de produit il est indispensable que les volumes de toutes les fractions soient identiques. Il est possible d'atteindre ce but avec une colonne bien préparée et travaillant sous pression constante. Si les volumes diffèrent trop, on doit opérer de la façon suivante : si la première fraction est de 7 ml, la seconde seulement de 6 ml, on ajoutera à la seconde fraction 1 ml de la troisième. Au troisième tube contenant alors encore p. ex. 5,6 ml on ajoutera 1,4 ml de la quatrième fraction et ainsi de suite. De cette façon toutes les fractions seront de 7 ml. Quand le nombre des fractions est assez élevé, comme c'est le cas, cette manière de procéder n'a aucune influence nuisible sur le résultat.

L'extinction dans l'U. V. de chaque fraction est mesurée

⁽⁶⁾ C. et G. MADER, *An. Chem.*, **25**, p. 1556 (1953).

à 276 m μ . Au cas où, lors de cette détermination on commence la partie ascendante d'une bande et que l'on dépasse p. ex. la valeur d'extinction de 2,0, on peut s'attendre à ce que la fraction suivante montera au dessus de 3,0 et ne pourra donc plus être mesurée par le photomètre. C'est pourquoi on prendra également l'extinction à une longueur d'onde plus élevée (380 m μ p. ex.) et on établira le rapport existant entre l'extinction à 380 et 276 m μ . La fraction qui dépasse la valeur de 3,0 à 276 m μ est alors mesurée à 380 m μ et, en tenant compte du rapport entre l'extinction à 380 et 276 m μ trouvé pour la fraction précédente on peut calculer la valeur à 276 m μ . Il est en effet inutile de tenir compte de l'extinction spécifique de l'humulone à 380 m μ (voir plus loin). Comme extinction spécifique pour les trois humulones à 276 m μ on prendra la valeur de 257. La quantité d'humulone se trouvant dans une bande contenant X fractions de volume V sera alors

$$\text{mg humulone} = \frac{\Sigma E.V.X}{X.0,257.100} = \frac{\Sigma E.V}{25,7}$$

Le spectre U. V. de l'humulone dans l'isooctane

Toutes les mesures photométriques ont été faites avec un appareil Unicam S. P. 500. Nous avons pu constater que les substances amères du houblon suivent la loi de Beer. Le spectre de l'humulone est déjà donné dans la Fig. 2. Nous avons trouvé les extinctions spécifiques suivantes pour l'humulone (moyenne de plusieurs déterminations). Pour les longueurs d'onde de 238, 276 et 325 m μ nous trouvons respectivement $E_1^1\%_{cm} = 384, 257$ et 178. Pour les longueurs d'onde de 238 et 276 m μ Aubert et Kringstad ⁽⁷⁾ renseignent les valeurs de 388 et 260, tandis que Nilson ⁽⁸⁾ publie 355 et 247. L'humulone employée pour nos déterminations était recristallisée plusieurs fois dans l'acide acétique à 50 % et fondait à 70°. Nous n'avons pas encore pu déterminer avec grande précision les valeurs de E pour l'ad-et la cohumulone. D'après Rigby toutefois (l. c.) les spectres de l'humulone et de la cohumulone dans le méthanol sont pratiquement identiques.

⁽⁷⁾ O. AUBERT et H. KRINGSTAD, *II^e Congrès international des industries de fermentation*, Knokke (1952) p. 165.

⁽⁸⁾ T. NILSON, 4 *Skand. Bryggerikjemikermøte* (1948).

Jusqu'ici on a toujours attribué à l'humulone le point de fusion de 65° ⁽⁹⁾. Lorsqu'il fond à cette température il peut être d'ailleurs pratiquement pur tel que le démontre le graphique de la Fig. 7.

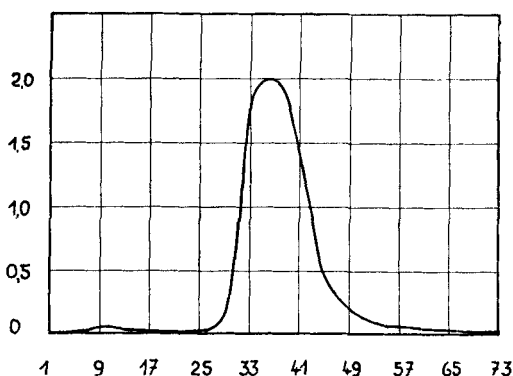


Fig. 7. Chromatographie d'humulone purifiée et fondant à 65° .

Comme l'humulone absorbe encore considérablement à $325\text{ m}\mu$ on pourrait croire que cette longueur d'onde serait la meilleure pour la mesure des extinctions. A cette longueur d'onde en effet on doit moins craindre l'interférence d'un « background » éventuel et on peut travailler avec les cellules de verre et la lampe à filament de tungstène. Toutefois, la sta-

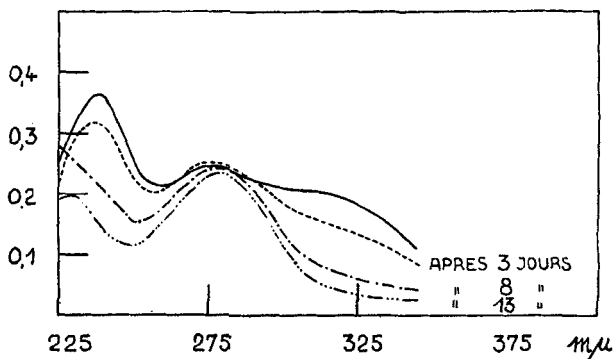


Fig. 8. Changements du spectre U. V. de l'humulone dans l'isooctane pur.

⁽⁹⁾ W. WÖLLMER, B 49, 780.

bilité de l'humulone en solution dans l'isooctane est plutôt faible (4) et l'extinction diminue particulièrement vite à la longueur d'onde de 325 m μ . Fig. 8.

Cette stabilité est encore moindre pour les solutions sortant d'une colonne.

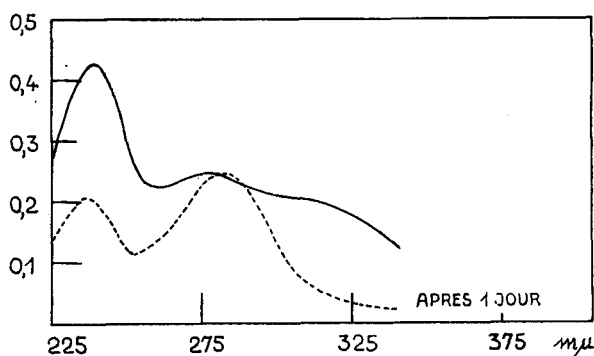


Fig. 9. Changements du spectre U. V. d'une solution d'humulone dans l'isooctane, sortant d'une colonne chromatographique.

Heureusement à 276 m μ l'extinction ne change guère au cours du temps, et quoique l'extinction mesurée à cette longueur d'onde ne provient pas uniquement de l'humulone, elle est quand même en rapport direct avec la concentration initiale de ce produit. En conséquence on mesurera l'extinction à 276 m μ , dans des cellules en quartz évidemment, et on prendra pour les trois humulones $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 257$.

C'est aussi pour assurer la stabilité de l'humulone que la colonne doit être protégée contre la lumière. On peut en effet voir sur la fig. 8 qu'après détérioration sous l'influence de la lumière, le spectre U. V. de l'humulone dans l'isooctane prend l'allure du spectre de l'humulinone (10,11) (voir fig. 2). Comme nous pouvons supposer que les mêmes changements se produisent dans une colonne exposée à la lumière et que l'humulinone (pK 2,8) est un acide beaucoup plus fort que l'humulone (pK 5,5), nous comprenons que le produit d'oxydation est retenu sur

(10) A. H. COOK et G. HARRIS, *J. Chem. Soc.*, 1873 (1950).

(11) M. VERZELE et F. GOVAERT, *J. Chem. Soc.*, 3313 (1952).

place dans la colonne lors de sa formation. Une colonne non protégée contre la lumière ne laissera donc pas passer la totalité des humulones et les pertes seront d'autant plus élevées que la luminosité est plus forte. D'après le tableau n° 1 nous voyons que la cohumulone est proportionnellement moins vite détruite et que la totalité des humulones est retrouvée sur une colonne complètement abritée contre la lumière.

TABLEAU I

Luminosité décroissante	% Humulone + adhumulone	% cohumulone	% des humulones retrouvé après la chromatographie
	79,8	20,2	78
	80,2	19,8	87
Obscurité	80,9	19,1	93
complète	81,5	18,5	100

Laboratorium voor Organische Scheikunde
(Prof. F. Govaert)
UNIVERSITEIT TE GENT.