

35. Dosage simultané de la di-iodo-3,5-tyrosine, de la di-iodo-3,5-thyronine et de la thyroxine par nitration suivie d'une réduction polarographique et par détermination colorimétrique de l'iode libéré

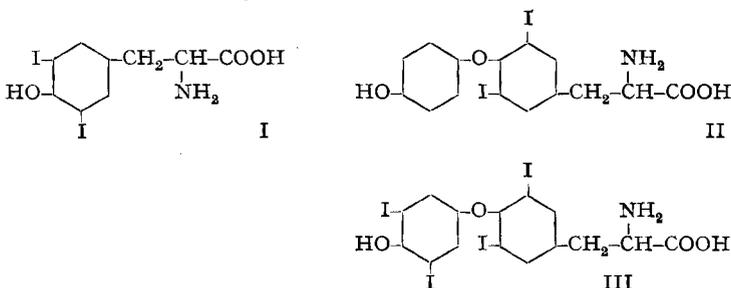
par D. Monnier et H. Keller

(13 XI 61)

I. Etude analytique de la nitration

1. *Introduction.* Les procédés de dosage classique des produits hormonaux thyroïdiens portent sur la totalité de l'iode organique, mais ils fournissent des résultats qui ne sont pas en accord avec les données de la physiologie. On s'est alors efforcé de doser les acides aminés iodés par des méthodes optiques (absorption dans l'UV., spectrophotométrie de complexes colorés, etc.) ou par polarographie, mais ces méthodes manquent en général de précision. La séparation par chromatographie est longue et ne permet pas toujours un dosage précis. Quant aux méthodes biologiques qui ont l'avantage d'être très sélectives et très sensibles (parfois trop), elles sont fort longues, peu précises et nécessitent un matériel biologique important.

Nous nous sommes proposé de mettre au point un dosage sélectif de trois acides aminés iodés parmi les plus importants: la di-iodo-3,5-tyrosine (I), la di-iodo-3,5-thyronine (II) et la thyroxine (III). Notre procédé comprend une nitration de ces substances dans des conditions rigoureusement déterminées, la polarographie des mélanges nitrés obtenus et une mesure colorimétrique de l'iode libéré au cours de la réaction. En jouant sur les propriétés des composés obtenus, sur leur solubilité et sur la quantité d'iode libéré, il est possible de doser ces trois acides en présence les uns des autres dans un mélange.



Une étude préliminaire nous a montré que, par ébullition de deux heures avec HNO₃ 0,15M, la thyronine se nitre aussi bien que la tyrosine. Dans les deux cas, la réaction a parfois de la peine à se déclencher mais des traces de nitrite suffisent déjà à catalyser le phénomène qui devient alors parfaitement reproductible; les sauts sont dans ces conditions parfaitement dessinés et leurs hauteurs, proportionnelles à la concentration, entre $1,7 \cdot 10^{-3}M$ et $2,2 \cdot 10^{-4}M$.

2. *Comportement des acides aminés iodés I, II et III, lors de la nitration.* On observe dans les conditions de nitration précisées ci-dessous, un dégagement d'iode pour I et

pour III. On peut supposer que, même lorsqu'on opère avec de l'acide nitrique pur (0,15M), il se forme de petites quantités d'acide nitreux, probablement indispensables à la réaction, consistant en l'introduction de groupes nitro en des positions occupées par des atomes d'iode. Cette manière de voir concorde avec la théorie de la nitration par substitution nucléophile de ZAHN¹⁾. On peut expliquer le mécanisme de cet effet catalytique par la théorie électronique d'ARNDT-EISTERT (voir thèse KELLER²⁾).

ROCHE³⁾, OTTAWAY⁴⁾ et WAAKLES⁵⁾ dosent les acides aminés iodés par colorimétrie de l'iode libéré par traitement à l'acide nitreux. Bien que ces auteurs n'aient pas recherché la nature des dérivés organiques obtenus, il s'agit sans doute de dérivés nitrés identiques à ceux qui se forment lors de la nitration.

Impossibilité d'une nitration sélective. Nous avons montré⁶⁾ que dans certains cas, il était possible d'augmenter la sélectivité de la nitration en jouant sur la concentration de l'acide nitrique (tyrosine-phénylalanine par ex., où on peut arriver à nitrer la seule tyrosine). Or dans le cas des dérivés aminés iodés étudiés, et bien que la nitration de la di-iodotyrosine se produise déjà avec HNO₃ 0,05M et que la réactivité diminue de I à III, on observe des phénomènes d'induction lors de la nitration de mélanges de ces acides, phénomènes qui ne permettent pas de réaliser une nitration nettement sélective.

Choix de la concentration de HNO₃. Pour une bonne sélectivité du dosage, cette concentration doit être aussi faible que possible à condition toutefois que les solutions nitrées obtenues donnent au polarographe des sauts reproductibles, proportionnels à la concentration, de hauteur suffisante et facile à mesurer. Ces hauteurs augmentent lorsqu'on passe de HNO₃ 0,05M à 0,15M, mais les sauts ne sont reproductibles et bien dessinés qu'à partir de cette dernière concentration. D'autre part, avec HNO₃ 0,15M, lorsque de l'iode est libéré, sa quantité est proportionnelle à celle des acides aminés dont l'iode est libérable. Une nitration avec HNO₃ 1M provoque une destruction de la molécule, avec dégagement de CO₂, de HCN et de gaz nitreux. Les sauts sont moins grands pour la di-iodotyrosine, un peu plus élevés pour la thyroxine qu'avec HNO₃ 0,15M. Lorsqu'on nitre par un mélange NaNO₃-H₂SO₄ conc. par contre, les sauts diminuent beaucoup pour les trois acides iodés, mais ils ne disparaissent jamais complètement.

Dans la suite de ce travail toutes les nitrations seront donc effectuées, sauf indication contraire, avec HNO₃ 0,15M, en présence de nitrite à l'ébullition pendant 2 heures.

3. *Etude chromatographique des mélanges de nitration. – Révélateurs.* Lorsque les dérivés nitrés se forment en des quantités relativement importantes, on obtient des taches jaunes, oranges ou rouges (taches figurées en traits pleins verticaux dans la fig. 1), directement visibles. Si on examine le chromatogramme en lumière UV., les composés nitrés se marquent par des taches sombres qu'on fixe par la suite au moyen du réactif d'EHRLICH. Ce dernier se compose de deux solutions qu'on fait agir succes-

1) H. ZAHN, Z. physiol. Chem. 312, 186 (1958).

2) H. KELLER, thèse 1333, Faculté des Sciences, Université de Genève 1961.

3) J. ROCHE, Biochem. biophys. Acta 1, 335 (1947).

4) J. H. OTTAWAY, Biochem. J. 68, 239 (1958).

5) T. P. WAAKLES, Lab. clin. Med. 50, 733 (1957).

6) D. MONNIER & J. VOGEL, Helv. 42, 1672 (1959).

sivement: une solution de SnCl_2 à 1% dans HCl 0,5M (pulvérisée sur le chromatogramme et séchée) et une solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde à 1% dans l'alcool 50%, 0,5% en HCl (pulvérisée et séchée). On obtient des taches intenses jaunes, oranges ou rouges (figurées par des traits pleins verticaux dans la fig. 1). Quant aux acides aminés non transformés et aux dérivés non désaminés (nitrés ou non), on les révèle par un traitement à la ninhydrine; ils donnent alors des taches violettes ou pourpres. Les traits horizontaux les caractérisent sur la fig. 1. Les taches marquées par des traits horizontaux et verticaux correspondent aux substances à réaction positive aux deux réactifs, soit aux dérivés aminés nitrés. Les traits pointillés indiquent que ces taches n'apparaissent que faiblement.

a) *Nitration de la tyrosine et de la di-iodotyrosine.* Nous avons déjà remarqué⁶⁾ que la nitration d'acides aminés comme la tyrosine ou le tryptophane dans les conditions ci-dessous donnait naissance à plusieurs composés. Pour faciliter la mise au point de notre méthode, il était utile de connaître la nature et les quantités relatives des substances formées lors de la nitration des acides I, II et III. Nous avons résolu partiellement ce problème grâce à la chromatographie ascendante sur papier WHATMAN no 1. N'ayant pas trouvé de renseignements concernant la chromatographie des dérivés obtenus par nitration des acides iodés, nous avons dû rechercher un solvant approprié. L'alcool butylique, la collidine, le phénol et la pyridine ne conviennent pas; les taches se présentent en traînées allongées et les séparations se font mal. Avec l'éthylène-glycol et le formiamide, les composés se déplacent avec le front du solvant.

Notre choix s'est finalement porté sur un mélange de 100 parties d'isobutanol et de 11 parties d'acide acétique 2M; lorsque'il n'est pas possible de travailler en milieu acide, on remplace l'acide acétique par de l'ammoniaque 2M. La chromatographie se fait entre 21° et 25° sur le mélange réactionnel obtenu à partir de 1 à 30 μg d'acide aminé iodé.

Etude qualitative. Dans un travail précédent⁶⁾, nous avons supposé que, lors de la nitration de la tyrosine par HNO_3 0,15M, il se formait plusieurs dérivés nitrés, mais comme les hauteurs des sauts polarographiques étaient proportionnelles à la concentration initiale de cet acide aminé et très reproductibles, nous en avons déduit qu'un de ces dérivés s'y trouvait en quantité tout à fait prépondérante.

Les chromatogrammes ci-dessus ne confirment pas cette hypothèse, car on voit (fig. 1; chromatogrammes 8, 9 et 10) qu'au moins deux dérivés s'y trouvent en quantité importante, dérivés que nous avons pu identifier avec la dinitro-3,5-tyrosine (Rf compris entre 0,04 et 0,06) et son analogue désaminé, l'acide dinitro-3,5-phényllactique (Rf 0,36 à 0,38). Pourtant cette dernière tache est souvent très étendue, elle est donc probablement constituée de plusieurs composés.

On observe parfois une tache correspondant à la nitro-3-tyrosine au Rf = 0.16 et une autre au Rf = 0,78; cette dernière n'a pu être identifiée de façon certaine. Nous pensons qu'il s'agit d'un dérivé nitré dont la chaîne latérale a été modifiée profondément, car cette même tache domine toutes les autres quand on nitre avec HNO_3 conc.

Les chromatogrammes 11 et 12 des produits de nitration de la di-iodotyrosine par HNO_3 0,15M sont simples; ils comprennent 2 taches, l'une au Rf = 0,04 (dinitro-3,5-tyrosine), l'autre dont le Rf est compris entre 0,34 et 0,36. Sa tache est donc placée un peu plus bas que celle de l'acide dinitro-3,5-phényllactique et se rapproche de celle

de l'acide dinitro-3,5-p-hydroxy-benzoïque (0,36). De toute façon ces chromatogrammes sont très semblables à ceux des produits de nitration de la tyrosine, ce qui n'est pas étonnant puisque la di-iodotyrosine perd la totalité de son iode au cours de cette nitration. Les résultats que nous avons obtenus sont très semblables à ceux de ZAHN¹⁾ qui a étudié l'oxydation de la tyrosine par HNO_3 2M. Selon la température et la durée de la réaction il obtient la nitrotyrosine, la dinitrotyrosine, des phénols nitrés, l'acide dinitro-3,5-p-hydroxy-benzoïque, l'acide dinitro-3,5-phényl-lactique, l'acide picrique, des benzaldéhydes nitrés et des composés tels que l'acide oxalique, l'anhydride carbonique et l'acide cyanhydrique.

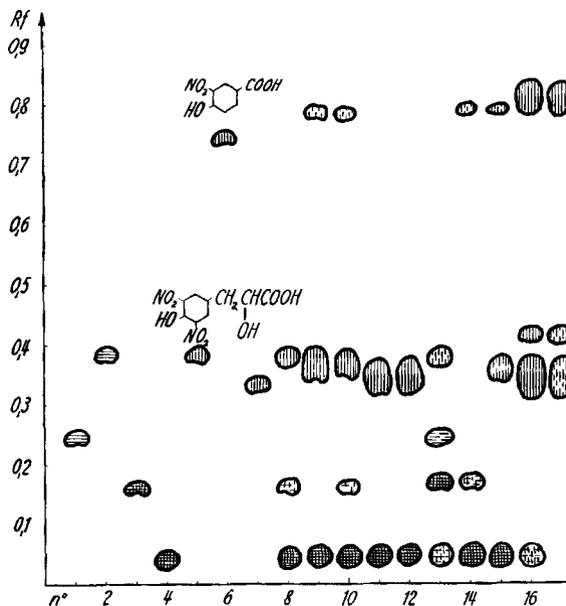


Fig. 1. Etude chromatographique des mélanges obtenus lors de la nitration de la tyrosine et de la di-iodotyrosine

1. Tyrosine.
 2. Di-iodotyrosine.
 3. Nitro-3-tyrosine.
 4. Dinitro-3,5-tyrosine.
 5. Acide dinitro-3,5-phényl-lactique.
 6. Acide nitro-3-p-hydroxybenzoïque.
 7. Acide dinitro-3,5-p-hydroxybenzoïque.
 8. } Tyrosine nitrée par HNO_3 0,15 M.
 9. } (reflux 2 h) (3 essais).
 10. }
 11. } Di-iodotyrosine nitrée par HNO_3 0,15 M et HNO_2 0,01 M, 2 h à reflux (2 essais).
 12. }
 13. HNO_3 0,05 M
 14. HNO_3 0,5 M
 15. HNO_3 1 M
 16. HNO_3 2 M
 17. HNO_3 5 M
- } Tyrosine nitrée 2 h à reflux, avec HNO_3 à diverses concentrations

Etude quantitative des produits de nitration de la tyrosine nitrée. Afin de connaître la proportion de chacun des composés nitrés, les taches ont été éluées et l'éluat a été polarographié selon la technique suivante:

On dépose sur une bande de papier chromatographique WHATMAN no 1 (de 50 mm sur 250 mm), 0,1 ml d'une solution des dérivés issus de la nitration de l'acide aminé étudié dont la concentration initiale doit être égale ou supérieure à 10^{-3} M. La bande est chromatographiée avec le mélange isobutanol-acide acétique (v. p. 292) jusqu'à séparation nette des taches (7 à 8 h). Puis on sèche à l'air et on découpe les taches qui sont placées dans un entonnoir (forme microanalytique) en verre fritté et on élue en plusieurs fois au moyen d'une solution de NaNO_3 0,1 M (électrolyte de base) et d'un tampon pH 5 (v. p. 308). Un schéma du dispositif est donné dans la Thèse H. KELLER²⁾. Le volume total utilisé doit être de 2 ml. L'éluat est directement introduit dans une microcuve polarographique.

Les produits de nitration de la dinitrotyrosine renferment, ainsi que le montre le chromatogramme de la fig. 1, la même quantité (approx.) de dinitrotyrosine et d'acide dinitrophényllactique.

Tableau I. Dosage des dérivés nitrés obtenus par nitration de 25,8 mg de tyrosine par HNO_3 0,15 M à reflux 2 h

Dérivés nitrés de la tyrosine	taches chromato- graphiques Rf	courant de diffusion de la tache éluée		% de la solution initiale
		en μA (10^{-8}A)	% de la somme des sauts	
Dinitrotyrosine	0,04	4,4	14,0	14,1
nitrotyrosine	0,16	0,72	2,1	4,3
Acide dinitro- phényl-lactique	0,36 0,38	26,4	77	78,0
Dérivé inconnu (2,4 dinitrophénol?)	0,78	1,2	3,5	3,6
somme des sauts		32,7	96,6	100
saut de la solution nitrée initiale		34,3	100	

b) *Nitration de la thyronine, des thyronines iodées et de la thyroxine (fig. 2).* Les chromatogrammes des produits de nitration de ces composés sont beaucoup plus complexes que les précédents. Pour identifier les constituants des mélanges, nous avons cherché à synthétiser un certain nombre des produits dont on pouvait supposer la formation (p. 308). Nous n'y sommes parvenus que partiellement. Nous n'avons pu obtenir une mononitro et une dinitrothyronine pures. Du reste l'absence de données physico-chimiques à leur sujet aurait exigé une étude poussée qui sortirait des cadres de ce travail.

Le chromatogramme des produits de nitration de la thyronine présente une tache à $R_f = 0,59$, si on nitre ce composé à 30° . Avec HNO_3 3 M, on obtient 2 taches très proches, R_f 0,14 et 0,17, mais qu'on ne peut différencier chimiquement; seule la tache 0,14 réagit avec la ninhydrine, révélant la présence d'un acide aminé. Les deux taches donnent avec le réactif d'EHRLICH la coloration jaune propre aux composés mononitrés. Donc nous sommes en présence de deux dérivés mononitrés, l'un aminé, l'autre désaminé.

Quand on pousse la nitration plus loin en élevant la température, la tache 0,14 faiblit et disparaît, la tache 0,17 par contre subsiste. D'autres font leur apparition, une tache orange à 0,31, une autre orange rouge à 0,07 et dans le même temps que cette dernière, une tache à 0,64. Les produits de nitration de la thyronine par HNO_3 0,15 M à reflux pendant 2 h donnent des résultats analogues (fig. 2, chromatogrammes 8 et 9).

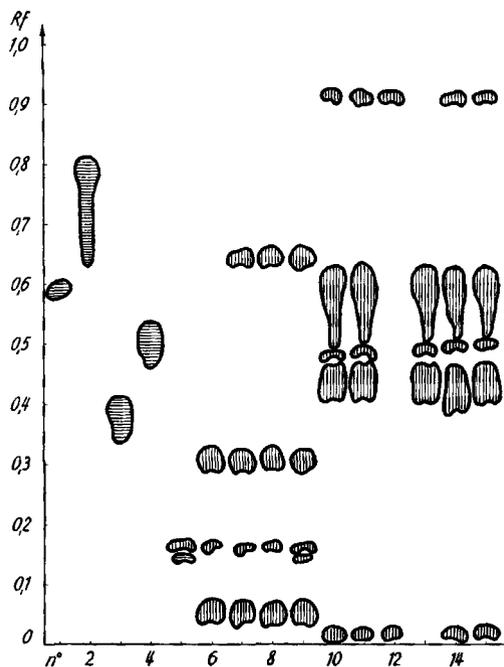


Fig. 2. Etude chromatographique des mélanges obtenus par nitration de la di-iodo-3,5-thyronine et de la thyroxine

1	thyronine	10	thyroxine nitrée	} nitration 2 h par HNO_3 0,15 M
2	thyroxine	11	solution complète	
3	di-iodo-3',5'-thyronine	12	thyroxine solution acide	
4	tri-iodo-3,3',5'-thyronine	13	thyroxine solution basique	
5	thyronine	14	di-iodothyronine nitrée	
6	} nitrée { 3 M, 30°, 1 h	15	di-iodothyronine nitrée	
7		par HNO_3 3 M, 70°, 2 h		
8	thyronine nitrée, 2 h			
9	par HNO_3 0,15 M			

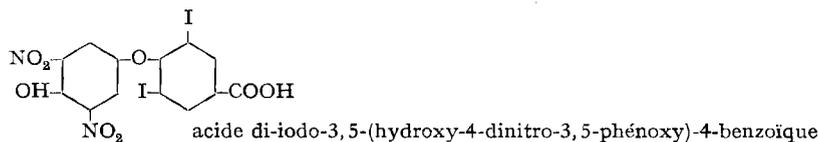
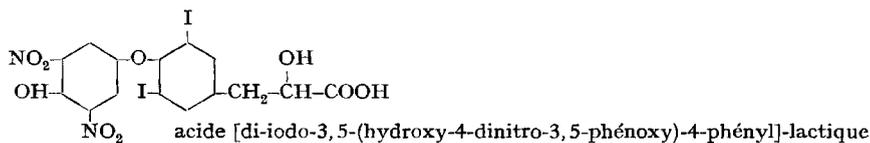
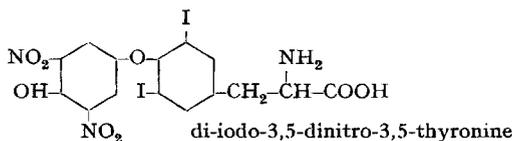
Les chromatogrammes des produits de la nitration de la thyroxine (10 et 11) ne ressemblent pas à ceux que fournissent la tyrosine et la di-iodotyrosine nitrées. Avec HNO_3 0,15 M, 2 h à reflux, on obtient 4 taches, dont les Rf sont: 0,02, 0,91, 0,44 et 0,55. Les deux dernières sont les plus importantes.

Les chromatogrammes des di-iodothyronines nitrées et celui de la thyroxine nitrée sont très semblables.

Interprétation. Lors de la nitration (HNO_3 0,15 M, 2 h à reflux) la di-iodo-tyrosine (I) perd la totalité de son iode; dans les mêmes conditions, la thyroxine (II) n'en libère que le 47 à 49%. Il s'agit donc de savoir si, dans le cas de III, les atomes d'iode en

3,3',5,5' participent tous plus ou moins à cette réaction. En faveur de cette hypothèse, citons l'hydrogénation catalytique (Pt) de la thyroxine, réalisée par HARRINGTON et RANDALL⁷⁾ à la pression ordinaire et au cours de laquelle les 4 atomes d'iodes sont libérés sous forme d'iodure. D'autre part, ROCHE⁸⁾ a montré que la désiodation *in vivo* et *in vitro* porte indifféremment sur l'iode en 3,3', 5 et 5'. Pourtant certains faits nous ont contraints à abandonner cette hypothèse. C'est ainsi que la nitration de la di-iodo-3,5-thyronine dans les conditions indiquées ci-dessus ne dégage pas d'iode (à peine 5 à 6% si on prolonge l'ébullition). Par contre, par une réduction très énergique on peut obtenir une minéralisation totale de l'iode.

De ces considérations et de l'examen des chromatogrammes de la fig. 2 on peut conclure que la nitration se limite aux positions voisines de la fonction OH. Ce sont les positions 3 et 5 dans la tyrosine, 3' et 5' dans la thyroxine. Ainsi s'explique le fait que la di-iodo-tyrosine libère 100% de son iode, la thyroxine, 50%, et la di-iodo-3,5-thyronine, 0%. Ce fait expérimental est confirmé par les considérations électroniques²⁾. On peut donc admettre que les composés nitrés de la di-iodo-3,5-thyronine et de la thyroxine sont constitués, entre autres, par les trois composés suivants:



4. *Etude polarographique des produits résultants de la nitration.* — a) *Réduction polarographique des dérivés nitrés purs.* Cette étude a été l'objet de nombreux travaux; citons ceux de PEARSON⁹⁾, HOLLEK¹⁰⁾, LUND¹¹⁾, ASTLE¹²⁾ et les nôtres⁶⁾. Il semble bien que le pH 5 soit le plus favorable, car alors la plupart des composés donnent une vague unique parfaitement dessinée, dont le $E_{1/2}^1$ est de $-0,4$ volt env. ($-0,15$ volt au pH 1 et $-0,68$ volt au pH 11). Quant au nombre d'électrons mis en jeu, les auteurs ne sont pas tous d'accord. Cependant LUND¹¹⁾ qui a effectué des mesures de réduction à potentiel contrôlé, remarque que les ortho-nitrophénols se réduisent jusqu'au stade de l'amine (6 électrons mis en jeu), tandis que les méta- et para-nitro-

⁷⁾ R. C. HARRINGTON & C. RANDALL, *Pharmacol.* 2, 501 (1929).

⁸⁾ J. ROCHE, *Biochem. biophys. Acta* 7, 335 (1947).

⁹⁾ J. PEARSON, *Trans. Farad. Soc.* 44, 683 (1948).

¹⁰⁾ L. HOLLEK, *Z. Elektrochem.* 59, 531 (1955).

¹¹⁾ H. LUND, *Acta chem. scand.* 12, 1444 (1958).

¹²⁾ M. J. ASTLE, *J. Amer. chem. Soc.* 65, 2395 (1943).

phénols donnent des hydroxylamines (4 électrons). Ces résultats concordent avec les nôtres.

Dans le tableau II nous donnons une liste de composés nitrés avec la hauteur de la vague et la constante polarographique K.

Remarques: a) A concentration molaire égale, le courant de diffusion des dérivés dinitrés est le double de celui des dérivés mononitrés.

b) Les dérivés nitrés des phénols ne donnent, au pH 5, qu'un seul saut, si le groupement nitro est en ortho (nitro-2-phénol et dinitro-2,6-phénol), dans les autres cas on a deux vagues.

Tableau II. Réductions polarographiques de dérivés mono- et di-nitrés (pH 5, tampon phosphate-citrate)

Substances	prises mg	conc, 10 ⁻³ mol/l	courants de diffusion μA	$K = \frac{\mu\text{A}}{(\text{conc.})}$
<i>Dérivés mononitrés</i>				
nitro-3-tyrosine	14,7	0,13	1,53	11,8
	56,5	0,25	3,08	12,3
	97,2	0,86	10,32	12,0
	124,0	1,10	13,09	11,9
	56,5	0,50	6,00	12,0
nitrate de nitro-3-tyrosine	15,9	0,11	1,32	12,0
	36,1	0,25	2,85	11,4
	36,1	0,25	2,88	11,5
	134,5	0,93	10,99	11,8
nitro-2-phénol	40,0	0,575	7,13	12,4
	40,0	0,575	7,24	12,6
	66,1	0,95	12,35	13,0
	34,8	0,50	6,40	12,8
	54,2	0,78	9,98	12,8
ac. nitro-3-hydroxy-4-benzoïque	109,6	0,12	1,37	11,4
	70,5	0,385	4,54	11,8
	70,5	0,770	9,24	12,0
	91,5	1,00	11,30	11,3
	109,6	1,20	13,20	11,0
	109,6	0,60	7,08	11,8
<i>Dérivés dinitrés</i>				
dinitro-3,5-tyrosine	35,2	0,13	3,15	23,2
	35,2	0,26	6,28	24,2
	46,0	0,34	7,99	23,5
	116,3	0,86	21,00	23,7
dinitro-2,6-phénol	14,7	0,16	4,00	25,3
	92,0	0,25	6,10	24,4
	92,0	0,50	12,60	25,2
	92,0	0,75	18,75	25,0
	92,0	1,00	24,90	24,9
	92,0	1,20	27,96	23,3
ac. dinitro-3,5-hydroxy-4-benzoïque	57,0	0,10	2,32	23,2
	57,0	0,20	4,58	22,9
	57,0	0,40	9,28	23,2
	57,0	0,50	11,60	23,2
	136,8	0,60	14,40	24,0
	91,2	0,80	19,04	23,8
	114,0	1,00	23,60	23,6
	136,8	1,20	27,96	23,3

Nos acides aminés iodés, donnent en général des produits nitrés seulement en ortho par rapport à l'hydroxyle phénolique, ces produits ne donnent donc qu'un saut.

c) Pour un même pH les $E_{1/2}$ sont tous très voisins ($-0,370$ à $-0,450$ volt ECS), si bien que le plus souvent les courbes polarographiques se superposent dans les mélanges.

d) Les dérivés mononitrés; le nitrophénol et la nitro-3-tyrosine par exemple, donnent des maximums, ce qui n'est pas le cas pour les dérivés dinitrés. Les mélanges de ces deux groupes de composés ne présentent pas de maximum, les dérivés dinitrés sont donc des «supprimeurs» de maximum, ce qui présente pour nos déterminations un avantage certain. On peut utiliser pour chaque groupe la même courbe d'étalonnage, les chaînes latérales non aromatiques n'ayant dans nos conditions de travail qu'un faible effet sur le coefficient de diffusion.

Dans la suite de ce travail, les nitrations se feront toujours avec HNO_3 0,15M, 2 h à reflux, en présence de petites quantités de nitrite, et les polarogrammes, au pH 5 ou éventuellement 7.

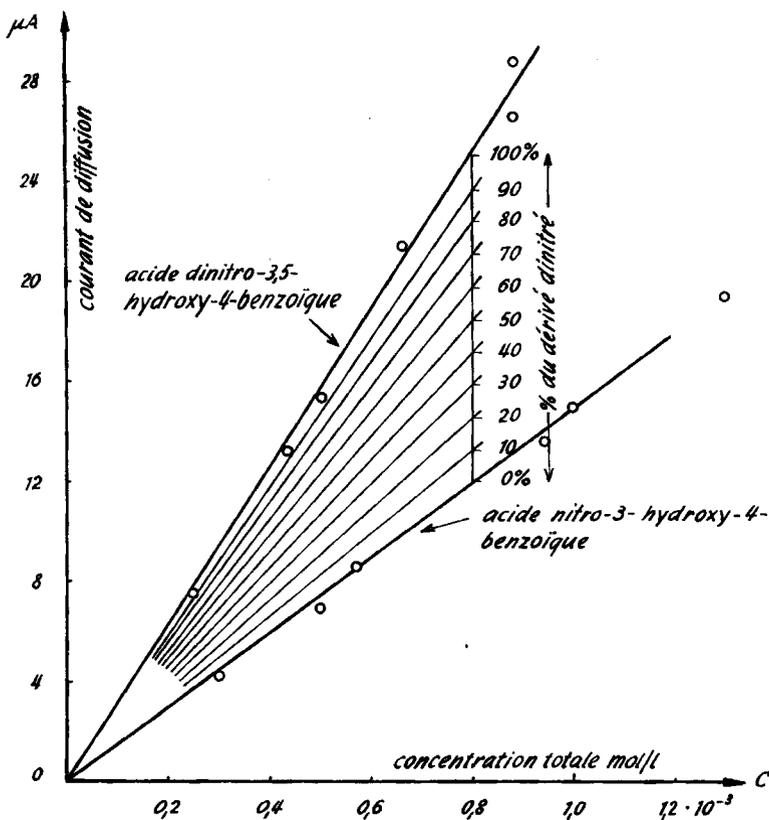


Fig. 3. Courbes d'étalonnages de mélanges de dérivés mono- et dinitrés de l'acide *p*-hydroxybenzoïque

b) Réduction polarographique d'un mélange de dérivés. Quelle que soit la complexité du mélange, on n'obtient qu'une seule vague (on distingue parfois sur l'écran du polarographe à rayons cathodiques une faible irrégularité de la courbe). Nous avons polarographié un certain nombre de mélanges de dérivés nitrés (mononitrophénol et dinitrophénol, nitrophénol et thyronine nitrée, acides *p*-hydroxybenzoïques mono- et

dinitrés entre eux ou avec des acides aminés nitrés). Dans tous les cas, le polarogramme n'est constitué que d'une seule vague parfaitement bien dessinée, dont la hauteur est la somme des sauts des composants du mélange, à savoir env. 12 mA/mol/l pour les dérivés mononitrés et 23 mA/mol/l pour les dinitrés.

On trouve aussi une seule vague pour des mélanges de dérivés mono-, di- et trinitrés.

La fig. 3 montre une série de droites qui sont des courbes d'étalonnage de mélanges d'acide nitro-3-hydroxy-4-benzoïque et d'acide dinitro-3,5-hydroxy-4-benzoïque. En abscisses sont portées les concentrations molaires totales; la droite inférieure correspond au premier de ces acides, pris isolément, la droite supérieure, au second, et les autres droites correspondent à des mélanges variables de ceux-ci. Ce graphique va nous permettre de comprendre pourquoi, bien que la nitration de la tyrosine, de la phénylalanine ou des acides aminés iodés donne des mélanges complexes de dérivés nitrés dont la concentration relative change quelque peu d'une opération à l'autre, il est possible d'établir des courbes d'étalonnage ou d'appliquer la méthode de l'étalon interne. Nous avons effectué une série de nitrations de 18 mg de tyrosine et les concentrations resp. du dérivé mononitré et du dérivé dinitré ont été évaluées. On observe une variation max. de 10% dans la composition du mélange, les hauteurs des sauts étant proportionnelles au nombre de groupements nitro dans la molécule, un mélange de 90% de dinitro et 10% de mononitro donne un saut propt. à $180 + 10 = 190$, un mélange de 97% de dinitro et 3% de mononitro donne un saut propt. à $194 + 3 = 197$, soit une différence max. de $\pm 1,8\%$.

Réduction polarographique des produits de nitration de la di-iodo-tyrosine. Les polarogrammes obtenus sont identiques à ceux que donne, dans les mêmes conditions (HNO_3 0,15M, faibles quantités de nitrites, 2 h à reflux, polarographie à pH 5) la tyrosine. Si on a soin d'éliminer totalement l'iode libéré par substitution, les deux courbes se recouvrent parfaitement ($E^{1/2} = -0,360$ V (ECS)). La courbe d'étalonnage est donnée à la p. 305.

Réduction polarographique des produits de nitration des iodothyronines, de la thyronine et de la thyroxine resp. Les différences observées dans les chromatogrammes entre les produits de nitration de la thyronine et ceux des iodothyronines se manifestent aussi au polarographe.

Nitrée, la thyronine donne un saut à $-0,390$ V (ECS), le courant de diffusion est un peu plus faible que celui des dérivés dinitrés purs. La nitration semble donc donner essentiellement des dérivés dinitrés.

La thyroxine ne perd lors de la nitration que la moitié de son iode, très probablement comme nous l'avons vu, les atomes d'iode en 3' et 5'. D'autre part, BORROWS¹³⁾ et SIMPSON¹⁴⁾ ont montré que la thyroxine telle qu'elle donne par les 4 atomes d'iode des sauts polarographiques à des potentiels de $-1,20$ à $-1,70$ volt (ESC). Or, si les atomes d'iode en 3 et en 5 subsistent après la nitration, la molécule nitrée et iodée doit se réduire en deux temps, les groupes NO_2 d'abord et les atomes d'iode après. Les polarogrammes effectués au pH 7 (ces dérivés ne sont pas solubles en milieu

¹³⁾ E. T. BORROWS, J. chem. Soc. 95, 204 (1949).

¹⁴⁾ G. K. SIMPSON, Biochem. J. 41, 116 (1947).

acide), donnent en effet un saut à $-0,39$ volt et un autre à $-1,50$ volt, ce qui cadre avec les observations des auteurs cités.

Quant à la di-iodo-3,5-thyronine, qui nitrée donne un saut à environ $-1,50$ volt, ses produits de nitration se comportent comme les dérivés nitrés de la thyroxine, et ceci confirme l'hypothèse que la nitration ne touche que l'iode fixé sur le noyau aromatique hydroxylé.

Nos considérations sont résumées dans le tableau III.

Tableau III. Nitration des acides aminés iodés I, II et III, libération de l'iode et potentiel $E_{1/2}$ des sauts polarographiques

Composé nitré HNO_3 0,15 M 2 h reflux (nitrite)	nombre d'atome d'iode		sauts polarographiques «NO ₂ » réduction du groupe nitro «I» réduction d'iode
	dans la mol.	libéré	
tyrosine	0	0	1 saut «NO ₂ » $E_{1/2} = -0,36$ V
thyronine	0	0	1 saut «NO ₂ » $E_{1/2} = -0,37$ V
di-iodo-3,5-tyrosine	2	2	1 saut «NO ₂ » $E_{1/2} = -0,36$ V
di-iodo-3,5-thyronine	2	0	2 sauts «NO ₂ » $E_{1/2} = -0,39$ V et «I» $E_{1/2} \cong -1,50$ V
thyroxine	4	2	2 sauts «NO ₂ » $E_{1/2} = -0,39$ V et «I» $E_{1/2} \cong -1,50$ V

II. Séparation de l'iode des dérivés nitrés, et dosage de l'iode

La méthode de dosage que nous proposons est basée sur la nitration des acides I, II und III avec HNO_3 0,15 M à l'ébullition (2 h) en présence de nitrite, sur la détermination polarographique de dérivés nitrés obtenus et sur la mesure colorimétrique de l'iode libéré. Une séparation de l'iode est nécessaire car, soluble dans la solution nitrique à raison de $5 \cdot 10^{-3}$ M (20°), il gêne la détermination polarographique, puisqu'il donne une vague à $E_{1/2} = -0,27$ volt (ECS), voisine de celle des groupes nitro. D'autre part, on ne peut doser l'iode en présence de ceux-ci. La séparation par réduction de l'iode en iodure ne nous a pas donné satisfaction; nous avons donc recouru à l'extraction. Une série de solvants ont été éprouvés. En tenant compte de la pureté des produits commerciaux, du coefficient de partage, de la volatilité et de l'intensité de la coloration que les divers solvants donnent avec l'iode, nous avons choisi le benzène comme permettant le mieux une détermination spectrophotométrique faite directement sur la phase organique.

a) *Séparation de l'iode de la solution de nitration.* Il n'est pas recommandé d'effectuer la nitration en présence du solvant organique pour plusieurs raisons: d'une part le point d'ébullition est abaissé ce qui modifie les conditions de la nitration, d'autre part certains solvants réagissent avec l'acide nitrique et les stabilisateurs qu'ils renferment sont partiellement nitrés. Enfin il est difficile de séparer les phases après la nitration par suite de l'effet émulsifiant des composés nitrés. Le dispositif de la fig. 4 permet d'effectuer simultanément la nitration et la séparation de l'iode par extraction, sans contact direct entre solvant organique et milieu nitrant. Le benzène répond à la plupart des exigences énoncées plus haut, sauf en ce qui concerne la sensibilité de la coloration (coefficient d'extinction moléculaire $\epsilon = 435$ à 519 m μ). Il peut être

obtenu très pur et son action sur l'iode est nulle, même après plusieurs mois de contact. Le coefficient de partage est de 88 et les phases se séparent bien, même après nitration prolongée. Des résultats identiques ont été obtenus avec le toluène et les xylènes. Par contre le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le tri- et tétrachloréthylène ne conviennent pas.

En *A*, on introduit l'échantillon avec 40 ml de HNO_3 0,15 M et en *B* un volume connu, par ex. 10 ml de solvant et 4 ml d'une solution de NaNO_2 0,1 M; *C* est un réfrigérant à reflux. La vapeur d'eau chargée d'iode barbote en *B*, l'iode se dissout dans le solvant, l'eau condensée rejoint la phase aqueuse et retourne par le trop plein dans le récipient *A*.

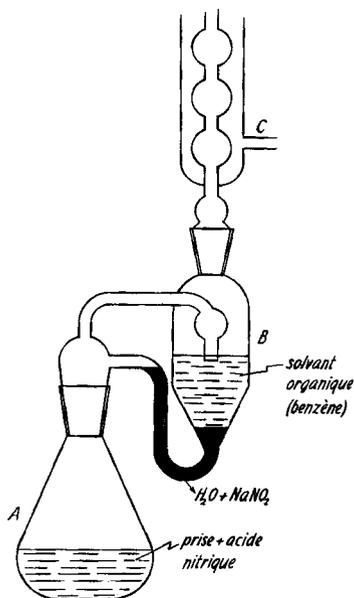


Fig. 4. Appareil de nitration et de séparation de l'iode libéré

b) *Etude quantitative de la distillation de l'iode.* Afin d'établir les conditions les meilleures d'une séparation de l'iode par distillation, nous avons d'abord effectué une série d'essais sur des solutions pures d'iodure de potassium de concentrations connues, oxydée par l'acide nitrique en présence de nitrite. Selon NATELSON & CUSTER¹⁵⁾ l'acide nitreux doit être en excès; pourtant nous obtenons de très bons résultats en introduisant dans le dispositif de la fig. 4, en *B*, 4 ml d'une solution de NaNO_2 0,1 M qui s'écoule goutte à goutte au cours de la nitration. La réaction est du reste déclenchée par la première goutte et 99% de l'iode ont été entraînés au bout de 15', pour des quantités d'iodure comprises entre 1 à 50 mg, d'iode.

Afin de fixer les limites inférieures d'iode susceptible d'être séparé par ce procédé, nous avons eu recours à l'iode ¹³¹I (solution de K^{131}I à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et $5 \cdot 10^{-12}$ $\mu\text{g}/\text{ml}$). La distillation s'est effectuée sur des prises contenant 10^{-11} à 10^{-4} g d'iode, soit 0,00001 μg à 100 μg . Les résultats sont donnés dans le tableau IV. Pour 1 μg , les pertes sont

¹⁵⁾ P. NATELSON & J. CUSTER, *Analyt. Chemistry* 27, 1005 (1949).

de 5% environ, pour 10 μg elles sont négligeables. Si on dispose d'un indicateur radioactif de perte (iode 131), il est possible de distiller encore des quantités de l'ordre du nanogramme (10^{-9} g) et même moins.

Tableau IV. *Oxydation d'iodure et distillation de l'iode, à partir de solutions pures de KI marquées au ^{131}I*

(acide nitrique 0,15 M; petites quantités de nitrite de sodium; 2 ml de solution d'iodure actif, contenant environ 10^{-11} g d'iode)

Prise d'iode (g)	activités en cps des solutions								pertes d'iode (distillation)			
	initiale		benzène		eau du réceptif A		eau (siphon)		in- contrô- lables	pertes totales		
	cps	%	cps	%	cps	%	cps	%		%	%	g iode
env. 10^{-11}	30000	100	15500	51,7	9300	31,0	824	2,7	14,6	48,3	4,8	$4,8 \cdot 10^{-12}$
$1,27 \cdot 10^{-9}$	30000	100	14700	48,8	11100	37,0	1150	3,8	10,4	51,2	6,5	$6,5 \cdot 10^{-10}$
$1,27 \cdot 10^{-8}$	29600	100	19950	68,1	8300	28,0	320	1,1	2,8	31,9	4,05	$4,05 \cdot 10^{-9}$
$6,35 \cdot 10^{-8}$	31200	100	24700	79,3	4000	12,8	250	0,8	7,1	20,7	1,31	$1,31 \cdot 10^{-8}$
$1,27 \cdot 10^{-7}$	31000	100	25400	81,8	3700	12,0	280	0,9	5,3	18,2	2,31	$2,31 \cdot 10^{-8}$
$6,35 \cdot 10^{-7}$	31000	100	28200	91,1	2200	7,1	92	0,3	1,5	8,9	5,65	$5,65 \cdot 10^{-8}$
$1,27 \cdot 10^{-6}$	32600	100	31160	95,6	1040	3,2	260	0,8	0,4	4,4	5,5	$5,5 \cdot 10^{-8}$
$6,35 \cdot 10^{-6}$	29600	100	27980	94,5	680	2,3	205	0,7	2,5	5,5	34,9	$34,9 \cdot 10^{-8}$
$1,27 \cdot 10^{-5}$	30000	100	29900	99,5	55	0,2	90	0,3	—	—	—	—
$6,35 \cdot 10^{-5}$	31000	100	30800	99,5	110	0,4	62	0,2	—	—	—	—
$1,27 \cdot 10^{-4}$	30600	100	30300	99,7	70	0,25	40	0,1	—	—	—	—

Nous avons aussi constaté que si on réduit les dimensions de l'appareil en utilisant un erlenmeyer de 40 ml au lieu de 250 ml et si on travaille sur 5 ml de solution au lieu de 40 ml, les pertes sont réduites de 50%.

c) *Dosage de l'iode.* Après une série d'essais au cours desquels nous avons étudié différentes méthodes de dosage: polarographie, gravimétrie, titrimétrie, ampérométrie, nous arrivons à la conclusion que le dosage colorimétrique présente dans nos conditions de travail, le plus d'avantage. Peu utilisé, à tort selon SLOANE¹⁶⁾, il est rapide et précis.

Pour mettre au point cette méthode, nous nous sommes inspirés de celle de NATELSON & CUSTER¹⁵⁾. La densité optique est directement mesurée sur la solution benzénique du compartiment B, fig. 4, à laquelle on ajoute le benzène de rinçage et de lavage en quantité telle qu'on se trouve dans la meilleure partie de la courbe d'éta-lonnage (fig. 6, courbe I), établie pour des concentrations comprises entre 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 1 mg/ml . Le principal inconvénient de cette détermination colorimétrique est son manque de sensibilité ($\epsilon = 560$), qui ne permet pas le dosage de traces. La méthode catalytique par contre est très sensible, mais selon BARKLEY¹⁷⁾, elle est peu reproductible et très délicate. De plus elle s'applique mal à notre cas, aussi avons-nous cherché à augmenter l'intensité de la coloration. NATELSON & CUSTER¹⁵⁾ ont montré que le

¹⁶⁾ G. H. SLOANE, *Biochem. J.* 73, 8p (1959).

¹⁷⁾ R. A. BARKLEY, *Analyt. Chemistry* 32, 154 (1960).

complexe I_3^- est utilisable pour un dosage colorimétrique, et OVENSTONE¹⁸⁾, que ce complexe peut se former dans le chloroforme et le tétrachlorure de carbone. Mais comme ces solvants ne peuvent être utilisés dans notre cas, nous avons été conduit à étudier les possibilités d'obtenir ce complexe en milieu benzénique. Or le KI ne se dissout ni dans le benzène, ni dans le mélange benzène-alcool absolu. Pour que l'ion I_3^- se forme il faut donc ajouter un peu d'eau et de l'alcool pour obtenir une seule

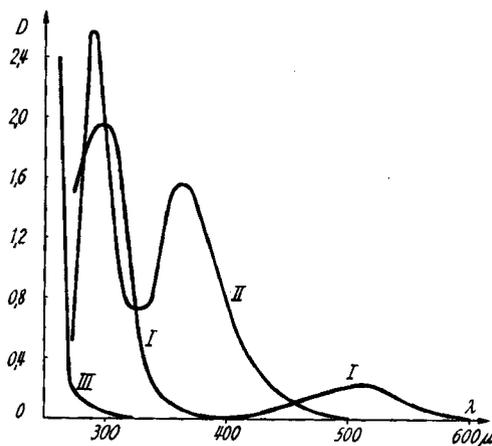


Fig. 5. Spectre d'absorption d'iode dans le benzène

I benzène pur + 100 μg iode/ml
 II benzène (8 p), alcool 95% (2 p) + 13 μg iode/ml + 4 mg KI/ml
 III benzène pur (sans iode)

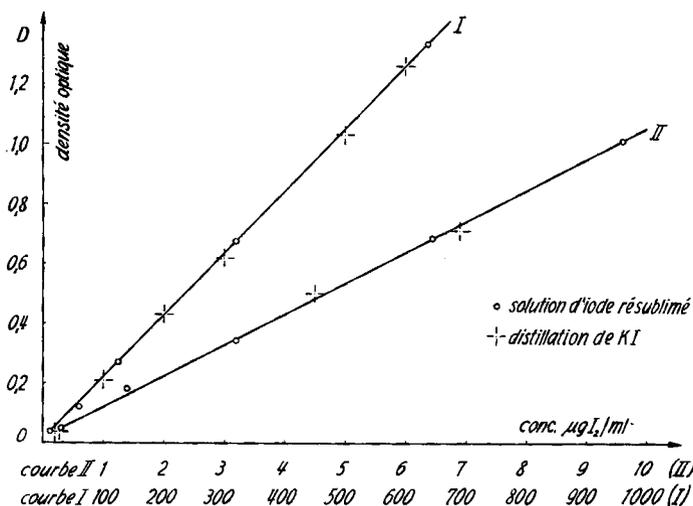


Fig. 6. Courbes d'étalonnage colorimétrique d'iode (appareil EPPENDORF, cuve 1 cm)

I; iode dans benzène pur, longueur d'onde (Hg) 513 $m\mu$
 II; iode dans benzène (8 p) alcool 95% (2 p), 4 mg KI/ml, longueur d'onde (Hg) 365 $m\mu$

¹⁸⁾ T. C. OVENSTONE, *Analyt. chim. Acta* 5, 123 (1951).

phase, et le rapport benzène-alcool-eau doit être soigneusement déterminé de telle sorte que ϵ reste constant, même si on fait varier quelque peu la concentration des constituants. Nous avons constaté que l'alcool de 90 à 97% permet d'obtenir des mélanges homogènes riches en benzène, contenant des quantités suffisantes d'eau. Pour nos travaux nous avons toujours utilisé l'alcool pharm. à 95-96%. Dans ces conditions la quantité de KI est sans influence sensible sur la coloration s'il est en excès suffisant.

La sensibilité de la méthode est env. 50 fois plus grande qu'avec le benzène seul. Les spectres d'absorption sont donnés dans la fig. 5, les courbes d'étalonnage sont représentées dans la fig. 6, le mode opératoire détaillé se trouve en bas.

III. Mode opératoire pour le dosage de la di-iodo-3,5-tyrosine (I), de la di-iodo-3,5-thyronine (II) et de la thyroxine (III)

Le procédé est identique pour I, II et III. Une prise renfermant $3 \cdot 10^{-2}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ mole du composé à doser, neutralisée le cas échéant (HNO_3 ou NaOH) est introduite dans un erlenmeyer de 200 à 250 ml de l'appareil de la fig. 4. Le volume est porté à 30 ml par addition d'eau distillée (si la prise renferme la thyronine iodée et (ou) la thyroxine peu solubles dans les acides, on la dissout d'abord dans 1 à 2 ml d'une solution NaOH 0,1 M. En effet, la réaction de nitration est beaucoup plus régulière sur une suspension obtenue par acidulation d'une solution alcaline). On ajoute 3 ml d'acide nitrique 2 M et on porte à 40 ml par de l'eau distillée, quelques morceaux de pierre ponce régularisent l'ébullition. En B (fig. 4) on introduit 4 ml de nitrite de sodium 0,1 M, puis 7 à 10 ml de benzène. La surface de séparation entre les phases doit se trouver à quelque 2 cm du coude inférieur et le nitrite ne doit pas s'écouler avant le début des opérations.

On place le réfrigérant sur l'appareil et on porte à l'ébullition pendant 2 h. La réaction se déclenche dès que la première goutte de la solution de nitrite tombe dans A. Après 2 h on laisse refroidir en évitant un retour de l'eau du siphon B dans l'erlenmeyer A, car elle est saturée de benzène et d'iode.

Dosage de l'iode. On sépare la phase aqueuse de la solution benzénique. Si la concentration d'iode dans cette dernière phase est très grande, on lave la phase aqueuse 2 à 3 fois avec du benzène pur, puis on détermine la densité optique de la phase benzénique à 519 $m\mu$, par rapport à une solution de benzène pur (fig. 6, courbe I). Si la coloration rouge-violet n'est pas perceptible à l'œil nu, on ajoute à 8 ml de la solution benzénique d'iode, 2 ml d'une solution alcoolique (alcool 95%) de KI à 2%. La densité optique est mesurée à 366 $m\mu$, par rapport à une solution renfermant 8 ml de benzène pur et 2 ml de la solution alcoolique d'iodure de potassium à 2%. La courbe d'étalonnage est donnée dans la fig. 6 (courbe II).

Dosage polarographique des mélanges de nitration. Il se fait sur la solution de l'erlenmeyer après distillation de l'iode. Si cette solution n'est pas limpide, c'est-à-dire si l'échantillon contient de la di-iodothyronine ou de la thyroxine, on filtre (ou centrifuge) après avoir refroidi la solution à 2° ou 3° pour diminuer la solubilité, et on lave deux fois avec très peu d'eau glacée, acidulée à l'acide nitrique 10^{-3} M env.

Le filtrat (ou la solution initiale s'il n'y a pas de précipité) est introduit dans un ballon de 50 ml, on neutralise avec NaOH 20% et on complète au trait de jauge par de l'eau distillée. On obtient ainsi la solution «a», prête pour la polarographie, le NaNO_3 constituant l'électrolyte de base.

Le précipité éventuel est dissous dans 25 à 35 ml de NaOH 0,1 M. On obtient une solution rouge-orange qu'on porte au pH 8 par addition de HNO_3 2 M et qu'on complète à 50 ml par de l'eau distillée. On obtient ainsi une solution «b». On prélève 5 à 8 ml des solutions «a» et «b», on ajoute 2 ml d'une solution tampon phosphate/citrate pH 5 en «a» et un tampon phosphate pH 7 en «b» (v. p. 308) et on porte les deux solutions à 10 ml par addition d'eau distillée. On chasse l'oxygène par barbotage d'azote purifié, pendant 10 min, stabilise la température à 22° par exemple, et polarographie (caractéristiques de l'appareil v. p. 308). On mesure les sauts polarographiques, dont les $E^{1/2}$ se situent à -0,38, -0,50 et -1,40 volt (ECS). Si on prend comme électrode de référence le mercure du fond de la cuve, les potentiels se déplacent d'environ -0,15

volt. On détermine les quantités des acides aminés iodés sur les courbes d'étalonnages données à la fig. 7 ou par la méthode de l'étalon interne.

La *di-iodotyrosine* donne un seul saut très bien dessiné à $-0,40$ volt environ, et on récupère dans le benzène, 98 à 99% de l'iode total. Les résultats pour une série de dosages sont donnés dans le tableau V et dans la fig. 7, courbe I. L'erreur standard a été calculée pour la constante polarographique K.

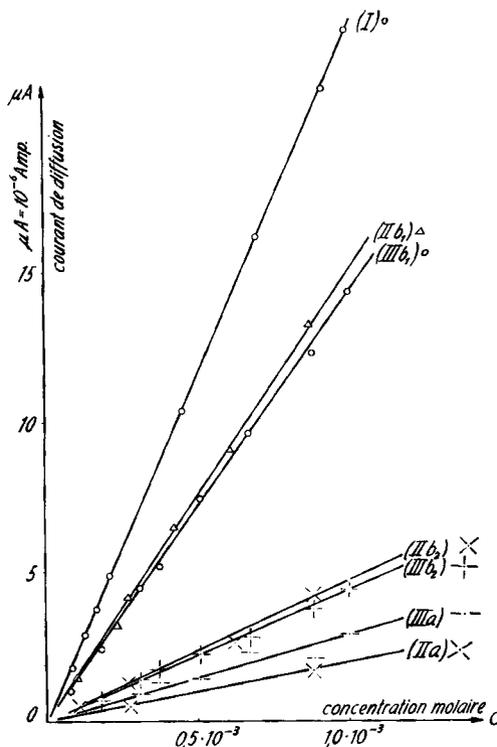


Fig. 7. Courbes d'étalonnages des produits de la nitration des acides I, II et III

di-iodo-3,5-tyrosine (courbe I)

di-iodo-3,5-thyronine (courbes IIa, IIb₁ et IIb₂)

thyroxine (courbes IIIa, IIIb₁ et IIIb₂)

Sauts polarographique de la solution «a» ($E^{1/2} \cong -0,4$ V) et de la solution «b»

(deux sauts: $E^{1/2} \cong -0,4$ V et $E^{1/2} \cong -1,4$ V)

Lors de la nitration, la *di-iodothyronine* donne un précipité, dont le polarogramme après filtration et mise en solution (solution «b») présente deux sauts, l'un au voisinage de $-0,40$ volt, dû aux dérivés nitrés, l'autre à $-1,40$ volt, qui correspond à la réduction de l'iode organique (voir tableau VI et fig. 7, courbes IIb₁ et IIb₂). Le filtrat renferme un peu de dérivés nitrés solubles dans les acides ainsi qu'une toute petite quantité d'iode minéralisé, ce qui fait que le polarogramme de la solution «a» présente un petit saut au voisinage de $-0,40$ volt (voir tableau VI et courbe IIa, fig. 7).

La *thyroxine* n'est pas soluble dans les acides. Au cours de la nitration, il se forme un précipité blanc qui tourne lentement au jaune en même temps qu'on observe un dégagement d'iode, correspondant à $48 \pm 1\%$ de l'iode total. Les polarogrammes sont identiques à ceux obtenus avec les produits de nitration de la di-iodo-3,5-thyronine, avec deux sauts, l'un à $-0,40$ volt et l'autre à $-1,40$ volt (voir tableau VII et fig. 7, courbes IIIa, IIIb₁ et IIIb₂).

Tableau V. Dosage de la di-iodotyrosine après nitration
courbe d'étalonnage I, fig. 7

prise mg	conc. mol/l	saut polar. $E^{1/2} = 0,36 \text{ V}$ μA	$K = \mu\text{A}/(\text{conc.})$ $\mu\text{A}/\text{mole/l}$
3,89	$0,083 \cdot 10^{-3}$	1,909	$23,0 \cdot 10^3$
6,19	$0,132 \cdot 10^{-3}$	2,87	$21,8 \cdot 10^3$
7,78	$0,166 \cdot 10^{-3}$	3,78	$22,8 \cdot 10^3$
9,84	$0,210 \cdot 10^{-3}$	4,87	$23,2 \cdot 10^3$
21,66	$0,462 \cdot 10^{-3}$	10,34	$22,4 \cdot 10^3$
33,20	$0,708 \cdot 10^{-3}$	16,14	$22,8 \cdot 10^3$
43,71	$0,932 \cdot 10^{-3}$	21,06	$22,6 \cdot 10^3$
47,36	$1,01 \cdot 10^{-3}$	23,02	$22,8 \cdot 10^3$
valeur moyenne de K		$22,7 \cdot 10^3 \mu\text{A}/\text{mol/l}$	
déviati on standard de K		$\pm 0,43 \cdot 10^3$	

Tableau VI. Dosage de la di-iodothyronine après nitration (solutions acide «a» et basique «b»)
courbes d'étalonnages II (IIa, IIb₁, IIb₂) fig. 7

prise mg	conc. mole/l	saut polar. 1 $E^{1/2} = -0,40 \text{ V}$ μA	$K' = \mu\text{A}/$ (conc.) $\mu\text{A}/\text{mole/l}$	saut polar. 2 $E^{1/2} = -1,4 \text{ V}$ μA	$K'' = \mu\text{A}/$ (conc.) $\mu\text{A}/\text{mole}$
<i>solution «a» (courbe IIa)</i>					
5,26	$0,10 \cdot 10^{-3}$	0,40	$4,0 \cdot 10^3$		
12,09	$0,23 \cdot 10^{-3}$	0,89	$3,9 \cdot 10^3$		
14,20	$0,27 \cdot 10^{-3}$	0,56	$2,1 \cdot 10^3$		
32,61	$0,62 \cdot 10^{-3}$	2,29	$3,7 \cdot 10^3$		
46,28	$0,88 \cdot 10^{-3}$	1,58	$1,8 \cdot 10^3$		
valeur moyenne de K			$3,1 \cdot 10^3$		
déviati on standard de K			$\pm 1,06 \cdot 10^3$		
<i>solution «b» (courbes IIb₁ et IIb₂)</i>					
5,26	$0,10 \cdot 10^{-3}$	1,43	$14,3 \cdot 10^3$	0,44	$4,4 \cdot 10^3$
12,09	$0,23 \cdot 10^{-3}$	3,17	$13,8 \cdot 10^3$	0,92	$4,0 \cdot 10^3$
14,20	$0,27 \cdot 10^{-3}$	4,13	$15,3 \cdot 10^3$	1,32	$4,9 \cdot 10^3$
32,61	$0,62 \cdot 10^{-3}$	8,99	$14,5 \cdot 10^3$	2,66	$4,3 \cdot 10^3$
46,28	$0,88 \cdot 10^{-3}$	13,20	$15,0 \cdot 10^3$	4,22	$4,8 \cdot 10^3$
valeur moyenne de K			$14,5 \cdot 10^3$		$4,48 \cdot 10^3$
déviati on standard de K			$\pm 0,59 \cdot 10^3$		$\pm 0,37 \cdot 10^3$

Cas de mélanges. Pour doser en présence les uns des autres, la tyrosine, la di-iodotyrosine et la thyroxine en tenant compte des vagues polarographiques des dérivés nitrés ainsi que de la vague des dérivés iodés et de l'iode libéré, on procède de la façon suivante: le mélange est traité comme indiqué pour les composés individuels. Après nitration avec HNO_3 0,15M, on prépare les solutions «a» et «b». Le polarogramme de la première donne la somme tyrosine + di-iodotyrosine ($E^{1/2} = -0,40$ volt). Une petite correction doit être apportée s'il y a beaucoup de thyroxine, pour tenir compte de la petite fraction nitrée soluble dans l'eau de cet acide (voir p. 305).

Tableau VII. Dosage de la thyroxine après nitration (solution acide «a» et basique «b») courbes d'étalonnages III (IIIa, IIIb₁, IIIb₂) fig. 7

Prise mg	(conc.) mol/l	saut polar. 1 $E^{1/2} = -0,39$ V μA	$K' = \frac{\mu\text{A}}{(\text{conc.})}$ $\mu\text{A/mol/l}$	saut polar. 2 $E^{1/2} = -1,4$ V μA	$K'' = \frac{\mu\text{A}}{(\text{conc.})}$ $\mu\text{A/mol/l}$
<i>solution «a» (courbe IIIa)</i>					
6,36	$0,082 \cdot 10^{-3}$	0,44	$5,4 \cdot 10^3$		
13,95	$0,180 \cdot 10^{-3}$	0,74	$4,1 \cdot 10^3$		
24,20	$0,312 \cdot 10^{-3}$	0,97	$3,2 \cdot 10^3$		
29,05	$0,374 \cdot 10^{-3}$	1,31	$3,6 \cdot 10^3$		
39,45	$0,508 \cdot 10^{-3}$	1,43	$2,8 \cdot 10^3$		
51,95	$0,670 \cdot 10^{-3}$	2,28	$3,4 \cdot 10^3$		
68,55	$0,883 \cdot 10^{-3}$	2,12	$2,4 \cdot 10^3$		
77,70	$1,00 \cdot 10^{-3}$	2,9	$2,9 \cdot 10^3$		
valeur moyenne de K			$3,47 \cdot 10^3$		
déviati on standard de K			$\pm 1,09 \cdot 10^3$		
<i>solution «b» (courbes IIIb₁ et IIIb₂)</i>					
6,36	$0,082 \cdot 10^{-3}$	1,07	$13,1 \cdot 10^3$	0,34	$4,1 \cdot 10^3$
13,95	$0,180 \cdot 10^{-3}$	2,43	$13,5 \cdot 10^3$	0,74	$4,1 \cdot 10^3$
24,20	$0,312 \cdot 10^{-3}$	4,46	$14,3 \cdot 10^3$	1,40	$4,5 \cdot 10^3$
29,05	$0,374 \cdot 10^{-3}$	5,15	$13,9 \cdot 10^3$	1,79	$4,8 \cdot 10^3$
39,45	$0,508 \cdot 10^{-3}$	7,46	$14,7 \cdot 10^3$	2,28	$4,5 \cdot 10^3$
51,95	$0,670 \cdot 10^{-3}$	9,64	$14,4 \cdot 10^3$	2,81	$4,2 \cdot 10^3$
68,55	$0,883 \cdot 10^{-3}$	12,36	$14,0 \cdot 10^3$	3,80	$4,3 \cdot 10^3$
77,70	$1,00 \cdot 10^{-3}$	14,3	$14,3 \cdot 10^3$	4,4	$4,4 \cdot 10^3$
valeur moyenne de K			$14,0 \cdot 10^3$	$4,36 \cdot 10^3$	
déviati on standard de K			$\pm 0,52 \cdot 10^3$	$\pm 0,265 \cdot 10^3$	

Le polarogramme de la solution «b» permet de calculer la concentration de la thyroxine. Le dosage de l'iode libéré donne la somme thyroxine + di-iodotyrosine, et par cette dernière la part de la tyrosine sur le saut $-0,40$ volt du polarogramme de la solution «a».

Il est possible de doser aussi la di-iodotyrosine, la di-iodo-3,5-thyronine et la thyroxine, en présence les unes des autres. Le polarogramme de la solution «a» donne la concentration de la di-iodothyrosine seule, celui de la solution «b», la somme de la di-iodo-3,5-thyronine et de la thyroxine. Enfin le dosage de l'iode libéré lors de la nitration donne la di-iodotyrosine et la thyroxine. A l'aide de ces trois données, on obtient les concentrations des 3 constituants. Dans les deux cas cités de mélanges d'acides aminés, le dosage de l'iode total par une des méthodes classiques, par exemple, selon BERTUCAT¹⁹⁾, constitue un moyen de contrôle des valeurs obtenues.

On constate que les polarogrammes de ces mélanges sont à peu près aussi reproductibles que ceux obtenus à partir des substances individuelles.

Appareillage, produits chimiques, solutions. Nous donnons ci-après la liste des appareils et des produits chimiques que nous avons utilisés au cours de notre travail.

Polarographe

Radiomètre type P O 3 c:	Copenhague	
	temps de goutte	2,63 s
	hauteur colonne de mercure	45 cm
	damping	5
	courant de compensation	0

¹⁹⁾ M. M. BERTUCAT, Bull. Soc. Pharmacie Bord. 93, 167 (1959).

Colorimètre

EPPENDORF, type 1: lampe à mercure
 filtre Hg 366 m μ , Hg 546 m μ
 cuve verre perméable à l'UV. proche

Compteur à scintillation

LANDIS & GYR, type O: potentiel d'activation 1200 V
 sensibilité moyenne 0,01 MeV

Produits chimiques (pro anal)

MERCK: HNO₃ d = 1,4, NaNO₂, ac. citrique NaOH, tyrosine
 SIEGFRIED: benzène, ac. acétique
 FLUKA: alcool isobutylique
 HOFFMANN-LA ROCHE: acides aminés iodés (pureté chromatographique contrôlée)
 thyronine
 di-iodotyrosine
 di-iodo-3,5-thyronine
 thyroxine

Synthétisés dans notre laboratoire:

(pureté chromatographique et F. contrôlés)
 ac. nitro-3-hydroxy-4-benzoïque
 ac. dinitro-3,5-hydroxy-4-benzoïque
 nitro-3-tyrosine
 dinitro-3,5-tyrosine
 ac. dinitro-3,5-phényl-lactique

Solutions

tampon pH 5,0	51,5 ml Na ₂ HPO ₄	0,2M
	48,5 ml ac. citrique	0,1M
tampon pH 7,0	50 ml KH ₂ PO ₄	0,1M
	29,1 ml NaOH	0,1M

RÉSUMÉ

Lorsqu'on traite la di-iodo-3,5-tyrosine, la di-iodo-3,5-thyronine et la thyroxine par HNO₃ 0,15M, on observe la formation de plusieurs dérivés nitrés et un dégagement du seul iode en ortho par rapport à la fonction phénolique. Une étude chromatographique et polarographique a permis d'identifier et de déterminer la concentration de la plupart de ces dérivés. La nitration est suffisamment reproductible pour permettre un dosage polarographique. La détermination de l'iode libéré fournit également une donnée pour le dosage de certains de ces acides aminés iodés. Une séparation est nécessaire pour laquelle un appareillage est proposé qui permet, en une seule opération, de nitrer, de distiller et d'extraire l'iode par le benzène. Le dosage des composés nitrés se fait par polarographie de la solution aqueuse, celui de l'iode dans la phase organique, par colorimétrie. Le comportement de l'iode au cours de la séparation a été étudié au moyen de l'iode 131.

La sensibilité de la méthode colorimétrique est fortement augmentée lorsque l'iode est complexé (I₃⁻).

On indique un mode opératoire permettant de doser les composants des mélanges suivants: tyrosine, di-iodo-tyrosine et thyroxine d'une part et di-iodo-tyrosine, di-iodo-thyronine et thyroxine d'autre part.

Laboratoires de Chimie minérale,
 de chimie analytique et de microchimie
 de l'Université de Genève