

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. PALAZZO, M. TAVELLA, G. STRANI & B. SILVESTRINI, *J. med. pharm. Chemistry* 4, 351 (1961).
- [2] C. MOUSSEBOIS & F. ELOY, *Helv.* 47, 838 (1964).
- [3] C. MOUSSEBOIS & J. F. M. OTH, *Helv.* 47, 942 (1964).
- [4] C. AGAMI, *Bull. Soc. chim. France* 1965, 1021.
- [5] L. FRIEDMAN & H. SHECHTER, *J. org. Chemistry* 25, 877 (1960).
- [6] M. GORDON & C. E. GRIFFIN, *Chemistry & Ind.* 1962, 1019.
- [7] M. CHARPENTIER-MORIZE & P. COLARD, *Bull. Soc. chim. France* 1962, 1982.
- [8] C. GRUNDMANN, *Liebigs Ann. Chem.* 555, 77 (1943).
- [9] A. J. SPEZIALE, L. R. SMITH & J. E. FEDDER, *J. org. Chemistry* 30, 1199 (1965).
- [10] L. M. JACKMAN, *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford 1959, p. 91.
- [11] M. MOUSSERON, R. FRAISSE, R. JACQUIER & G. BONAVENT, *C. r. hebdom. Séances Acad. Sci.* 248, 1465 (1959).
- [12] L. L. MCCOY, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 2246 (1962).
- [13] E. J. COREY & M. CHAYKOVSKY, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 1353 (1965).
- [14] R. MERCKX, *Bull. Soc. chim. Belges* 56, 339 (1947).

46. La réduction des groupes nitro aromatiques lors d'une hydrolyse acide en présence d'hydrates de carbone

par V. Handwerck†, E. Bujard et J. Mauron

(8 X 65)

L'emploi du fluoro-1-dinitro-2,4-benzène (FDNB), introduit par SANGER, offre une méthode de choix permettant, dans les protéines et les peptides, le dosage des acides aminés possédant un groupe amino libre. On sait toutefois depuis longtemps qu'une des plus sérieuses sources d'erreur provient d'une perte des DNP-amino-acides lors de l'hydrolyse de la protéine. Cette perte est généralement due à l'hydrolyse des DNP-amino-acides, libérant entre autres du dinitrophénol. Néanmoins, FRAENKEL-CONRAT [1] a suggéré qu'une réduction des groupes nitro pourrait aussi entrer en jeu, car une notable destruction des DNP-amino-acides est associée à la présence d'agents réducteurs. Il appuie son opinion sur une observation de CRAIG [2] montrant que la DNP-isoleucine terminale de la bacitracine A est récupérée avec un meilleur rendement après oxydation de la cystéine adjacente en acide cystéique.

D'autre part, la chimie de la nutrition réserve le nom de «lysine disponible» aux molécules de lysine faisant partie d'une chaîne protéique, mais dont le groupe ϵ -aminé reste libre. Mais il peut arriver que dans certaines conditions de température et d'humidité, ce groupe réagisse, en particulier par condensation avec des sucres réducteurs, selon un ensemble de mécanismes communément appelé réaction de MAILLARD [3], pour former des composés qui résistent à l'hydrolyse par les enzymes digestifs. On parle dans ce cas de «lysine bloquée», car celle-ci ne peut plus alors entrer dans les voies de son métabolisme normal, ce que des tests de croissance sur animaux mettent en évidence avec une grande sensibilité. Comme la lysine fait partie des acides aminés essentiels, c'est-à-dire ceux dont l'organisme humain est incapable

d'effectuer lui-même la synthèse, on conçoit l'importance de l'évaluation de la lysine disponible dans les protéines alimentaires [4].

Le dosage chimique de la lysine disponible a été développé par CARPENTER [5]: le FDNB, mis en présence de protéines, réagit avec les groupes aminés libres de celles-ci; après hydrolyse, on sépare l'*ε*-DNP-lysine des autres DNP-dérivés, et on la dose spectrophotométriquement. Nous avons appliqué cette méthode à des farines de poisson, des tourteaux de graines oléagineuses, des poudres de lait, par exemple. Comme on peut s'y attendre en conséquence de la réaction de MAILLARD, la quantité de lysine disponible diminue en fonction de l'intensité du traitement thermique subi au cours de leur fabrication industrielle, et les chiffres exprimant la lysine disponible sont toujours plus bas que ceux qui expriment la lysine totale, dosée après hydrolyse acide selon la méthode de SPACKMAN, STEIN & MOORE [6], car une partie de la lysine bloquée est récupérée au cours de cette hydrolyse [4].

Toutefois, dans le cas d'un lait lyophilisé, dans lequel on peut montrer, par d'autres méthodes, que toute la lysine présente est sous forme disponible, le dosage chimique de cette lysine par le FDNB donne une valeur inférieure d'environ 10% à la teneur totale en lysine. Une pareille différence ne peut s'expliquer uniquement par l'hydrolyse de la DNP-lysine elle-même, cette hydrolyse n'en détruisant que quelques pourcent au plus.

Nous avons pensé qu'une autre réaction pouvait expliquer cette perte de DNP-lysine; nous avons donc étudié le rôle joué par les sucres réducteurs au cours de l'hydrolyse de ce composé et de molécules analogues, et montré expérimentalement la réduction des groupes nitro en groupes amino.

La base de ce travail a déjà fait l'objet d'une communication orale [7]; tout récemment, et indépendamment de nous, la possibilité d'un tel mécanisme a également été mentionnée par EL-NOCKRASHY [8].

Partie expérimentale. — 1. *Produits de départ et abréviations.* Dinitro-2,4-phénol, amino-2-nitro-4-phénol (2-ANP), amino-4-nitro-2-phénol (4-ANP), diamino-2,4-phénol (DAP); dinitro-2,4-toluène; amino-2-nitro-4-toluène (2-ANT), amino-4-nitro-2-toluène (4-ANT), diamino-2,4-toluène (DAT).

A l'exception du 4-ANP provenant de la maison EASTMAN-KODAK, tous ces produits proviennent de la maison FLUKA. Ils ont tous été recristallisés dans l'eau, ou dans le mélange eau: éthanol et sont chromatographiquement purs.

L'*ε*-DNP-lysine, sous forme de son chlorhydrate, a été synthétisée selon PORTER & SANGER [9].

2. *Hydrolyses.* Pour l'*ε*-DNP-lysine, les conditions opératoires sont précisées dans le tableau 1. Des essais parallèles montrant la destruction du dinitrophénol ont été effectués dans des conditions identiques.

Les hydrolyses destinées à l'analyse chromatographique ont porté sur 200 mg de dinitrophénol ou de 4-aminotoluène, en présence de 5 g de lactose, dans 100 ml d'HCl 6 N, 24 h à reflux. Dans tous les cas, les hydrolysats obtenus ont été filtrés et dilués selon les besoins de l'analyse. Un léger précipité floconneux peut se former lors de dilutions ultérieures; il a été éliminé par filtration.

3. *Dosage de l'*ε*-DNP-lysine:* selon la méthode de CARPENTER [5] légèrement modifiée. La droite standard est obtenue à partir de solutions connues d'*ε*-DNP-lysine dans HCl 6 N (sans chauffage) soumises au même processus de dosage que les hydrolysats.

4. *Chromatographies* (v. tableau 2). Dans tous les cas, les substances de référence étaient en solution alcoolique.

ε-DNP-lysine et ses produits de réduction. *Solvant:* butanol:acide acétique:eau 2:1:2. Chromatographie descendante, 4 h sur papier WHATMAN n° 1.

Tableau 1. Destruction de l' ϵ -DNP-lysine lors de l'hydrolyse acide (Conditions: 24 h à reflux dans 100 ml HCl 6N)

Adjonctions	mg	ϵ -DNP-lysine, HCl	
		quantité initiale mg	destruction %
A.	aucune	20	2-4
	poudre de lait entier	200	20
	poudre de lait entier	250	20
	poudre de lait entier	500	20
B.	Caséine	70	10
	Caséine	140	20
	Caséine	700	10
	Insuline	70	10
	Insuline	700	10
C.	Acide gluconique	95	10
	Mannitol	190	20
	Sorbitol	190	20
D.	Glucose	190	20
	Fructose	95	10
	Saccharose	95	10
	Lactose	95	10
	Lactose	190	20
	Amidon	95	10
	Acide glucuronique	190	20

Dinitrophénol et ses produits de réduction. *Solvant*: butanol saturé d'eau. Conditions identiques.

Dinitrotolène et ses produits de réduction. *Solvant*: le mélange chloroforme:acétate d'éthyle 1:1 est saturé d'eau. On recueille la couche inférieure (organique). A 4 vol. de cette phase, on ajoute 1 vol. d'éthanol à 96%. Chromatographie ascendante en couche mince de silicagel sur support de polyester («Chromagram» d'EASTMAN-KODAK), 1 h $\frac{1}{4}$.

La séparation de 2-ANT d'avec 4-ANT est délicate; il est nécessaire d'évaporer à sec l'hydrolysate et de reprendre par H₂O distillée. Après dépôt sur la plaque, la tache de départ doit être exposée aux vapeurs d'HCl conc., puis aérée au moins 10 min par un jet d'air froid (séchoir à cheveux).

5. *Révélation des taches*. Nous avons utilisé un réactif spécifique des groupements aminés aromatiques (abréviation: NNED), formant un colorant par diazotation et copulation [10]:

Solution A: solution à 0,2% de NaNO₂ dans HCl 0,1 N.

Solution B: solution à 0,2% de N-(naphthyl-1)-éthylène-diamine, 2HCl.

Pour le dinitrophénol et ses produits de réduction, nous avons également utilisé une solution de benzidine bis-diazotée [11]. Ce réactif n'est pas spécifique des amines, mais, par les colorations

Tableau 2. Séparation chromatographique des dérivés aminés (conditions voir partie expérimentale)

Substance	Rf	Couleur après révélation à la NNED
2-ANP	0,41	pourpre vif
4-ANP	0,28	pourpre-violet
DNP	0,05	gris-violet
2-ANT	0,42	rose-orange
4-ANT	0,31	rose-pourpre
DNT	0,02	gris-violet

obtenues, il permet une confirmation supplémentaire de l'identité des taches provenant des hydrolysats avec celles des substances de référence.

Résultats. — 1. *Agents responsables de la destruction de l' ϵ -DNP-lysine.* La première série d'hydrolyses (tableau 1, A) a confirmé que l' ϵ -DNP-lysine, lorsqu'elle est hydrolysée seule, ne subit qu'une destruction négligeable (2–4%), tandis qu'en présence de poudre de lait entier cette destruction devient très forte.

Il était peu probable que la graisse joue un rôle important; nous avons alors recherché celui que jouent les protéines et les hydrates de carbone.

Deux protéines typiques ont été utilisées, la caséine et l'insuline (tableau 1, B). Il ressort des chiffres obtenus que les protéines interviennent probablement pour une certaine part dans la destruction de l' ϵ -DNP-lysine, et que ce phénomène ne peut être uniquement expliqué, dans le cas de la caséine, par le faible résidu d'hydrates de carbone liés à celle-ci. Le mécanisme en jeu nous est encore obscur et fera l'objet de nos recherches. Mais l'observation de CRAIG [2] citée au début peut être mise en relation avec la présence très probable dans la caséine des groupes –SH libres de la cystéine [12]. Cependant, on constate qu'en présence d'une quantité de protéine égale à 7 fois celle de l' ϵ -DNP-lysine, la destruction de cette dernière ne dépasse pas 8%. Puisque dans la première série d'essais les protéines du lait ne représentent pas plus de 5 fois la quantité d' ϵ -DNP-lysine, il est évident qu'elles ne sont pas le principal agent responsable de la forte destruction observée en présence du lait.

Finalement, nous avons pu faire ressortir le rôle essentiel joué par les hydrates de carbone. Les résultats (tableau 1, C et D) montrent immédiatement qu'une forte destruction de l' ϵ -DNP-lysine est toujours associée à la présence d'hydrates de carbone réducteurs ou qui, comme le saccharose et l'amidon, libèrent des sucres réducteurs par hydrolyse. Au contraire, le mannitol, le sorbitol et l'acide gluconique, dépourvus de ce caractère, n'affectent pas l' ϵ -DNP-lysine.

Ces faits ont également été confirmés sur une substance modèle, le dinitro-2,4-phénol, dont le comportement se révèle tout à fait identique. En effet, dans des conditions analogues aux précédentes, ce produit n'a montré aucune destruction lorsqu'il était hydrolysé seul ou en présence de mannitol, mais une importante destruction après hydrolyse conduite en présence de glucose ou de lactose.

Ces faits suggèrent bien que la destruction de l' ϵ -DNP-lysine doit provenir d'une réduction et non d'un clivage de la molécule.

2. *Mise en évidence des dérivés aminés.* Il restait donc à démontrer la formation de fonctions aminées aromatiques à partir des groupes nitro. Nous avons d'abord étudié cette réaction sur deux substances modèles, le dinitro-2,4-phénol et le dinitro-2,4-toluène, que nous avons soumises chacune à une hydrolyse en présence de lactose.

Dans les deux cas (tableau 2), l'analyse chromatographique a montré sans équivoque l'apparition des dérivés aminés correspondants: le dinitro-2,4-phénol donne naissance au 2-ANP (en quantité prépondérante), au 4-ANP et au DAP; de même le dinitro-2,4-toluène forme du 2-ANT, du 4-ANT et un peu de DAT; dans ce dernier cas, deux faibles taches supplémentaires, montrant aussi par leur réaction la présence d'un groupe aminé aromatique, n'ont pu être encore identifiées.

Enfin, les hydrolysats de l' ϵ -DNP-lysine en présence des diverses substances mentionnées plus haut ont eux aussi été analysés par chromatographie sur papier.

L'examen des taches obtenues après révélation par la NNED est en complet accord avec les constatations décrites ci-dessus: tandis que l'hydrolyse en présence de sorbitol ne produit aucun dérivé aminé, une tache à peine perceptible (Rf 0,45) apparaît en présence d'insuline; elle est encore très faible avec la caséine, tandis qu'avec le lactose et l'amidon, on constate la présence de deux taches intenses (Rf 0,37 pour la seconde). Elles témoignent bien de la réduction d'un ou de deux groupes nitro, car elles sont en tout point identiques à celles que l'on obtient en chromatographiant parallèlement une solution d' ϵ -DNP-lysine réduite par Sn + HCl. Nous ne pouvons pas encore préciser lesquelles de ces taches correspondent aux deux ϵ -aminonitro-phényl-lysines isomères et à la ϵ -diaminophényl-lysine, mais la synthèse de ces trois substances de référence est en cours et fera l'objet d'une prochaine publication.

Il reste également à savoir si la réduction des groupes nitro s'effectue sous l'influence directe de l'hydrate de carbone réducteur lui-même, ou si celle-ci est plutôt due à un produit de transformation de l'hydrate de carbone dans les conditions de l'hydrolyse.

Nous remercions la direction des Laboratoires pour l'autorisation de publier ce travail. Nous remercions également le Dr HANS ULRICH WEBER, alors étudiant en chimie, pour l'aide qu'il nous avait apportée dans une partie de ces recherches, ainsi que Mr CHARLES DORMOND pour sa collaboration technique efficace.

SUMMARY

The considerable losses of ϵ -(2,4-dinitrophenyl)-lysine during its acid hydrolysis in the presence of many foodstuffs have been shown to be principally due to the action of carbohydrates.

We have demonstrated that hydrolysing aromatic nitro compounds with HCl 6 N in the presence of reducing carbohydrates gives rise to the corresponding amino compounds.

Thus, 2,4-dinitrophenol produces 2-amino-4-nitrophenol, 4-amino-2-nitrophenol and 2,4-diaminophenol; 2,4-dinitrotoluene produces 2-amino-4-nitrotoluene, 4-amino-2-nitrotoluene and 2,4-diaminotoluene. Similarly, ϵ -DNP-lysine produces the corresponding amino compounds.

Laboratoires de Recherche des Produits NESTLÉ
(Dir. Dr R. H. EGLI),
La Tour-de-Peilz

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS & A. L. LEVY, dans «Biochemical Methods of Analysis», vol. 2, p. 368, Interscience Publishers 1955.
- [2] L. C. CRAIG, W. HAUSMANN & J. R. WEISIGER, J. Amer. chem. Soc. 76, 2859 (1954).
- [3] G. P. ELLIS, dans «Adv. Carbohydrate Chemistry», vol. 74, p. 63, Academic Press 1959.
- [4] J. MAURON, Int. Z. Vitaminforsch. 34, 96 (1964).
- [5] K. J. CARPENTER, Biochem. J. 77, 604 (1960).
- [6] D. M. SPACKMAN, H. W. STEIN & S. MOORE, Analyt. Chemistry 30, 1190 (1958).
- [7] V. HANDWERCK, E. BUJARD & J. MAURON, Biochem. J. 76, 54 P (1960).
- [8] A. S. EL-NOCKRASHY, Die Stärke 77, 89 (1965).
- [9] R. R. PORTER & F. SANGER, Biochem. J. 42, 287 (1948).
- [10] B. EKMAN, Acta chem. scand. 2, 1099 (1948).
- [11] K. S. KIRBY, E. KNOWLES & T. J. WHITE, J. Soc. Leather Trade's Chemists 35, 338 (1951).
- [12] R. BEEBY, Biochim. biophysica Acta 82, 418 (1964).