

1.42, *d*,  $J = 7$ ,  $\text{CH}_3(21)$ , 2.36, *s*,  $\text{NCH}_3$ , 2.70, *s*,  $\text{CH}_2(18)$ , 3.30, *s*,  $3\text{-OCH}_3$ , 3.84, *d*,  $J_{11,12\alpha} = 7$  (further splitting by  $J_{11,12\beta} = 4$ )  $\text{CH}(11)$ , 4.45, *q*,  $J = 7$   $\text{CH}(20)$ , 5.67, *t*,  $J = 2$   $\text{CH}(16)$ , 6.25, *d*,  $J_{6\beta,7} = 6$  (further splitting by  $J_{6\alpha,7} = 2$ )  $\text{CH}(7)$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ), identical according to MS. and thin-layer chromatography (3 different systems) with a sample prepared from natural batrachotoxinin A (**23**) by HCl/methanol treatment<sup>8</sup>). Finally **22** was converted (*p*-toluenesulfonic acid) to **23**, identical with natural batrachotoxinin A<sup>8</sup>) according to IR., NMR.<sup>9</sup>), MS., and thin-layer chromatography.

Financial support by CIBA-GEIGY AG, Basel, is gratefully acknowledged.

#### BIBLIOGRAPHY

- [1] *W. Graf, E. Gössinger, R. Imhof & H. Wehrli*, Helv., in Print.
- [2] *Ch. Meystre, K. Heusler, J. Kalvoda, P. Wieland, G. Anner & A. Wettstein*, Helv. 45, 1317 (1962).
- [3] *R. Imhof, E. Gössinger, W. Graf, W. Schnüriger & H. Wehrli*, Helv. 54, 2775 (1971).
- [4] *T. Tokuyama, J. Daly & B. Witkop*, J. Amer. chem. Soc. 91, 3931 (1969).
- [5] *H. Berner, L. Berner-Fenz, R. Binder, W. Graf, T. Grütter, C. Pascual & H. Wehrli*, Helv. 53, 2252 (1970); *L. Berner-Fenz, H. Berner, W. Graf & H. Wehrli*, Helv. 53, 2258 (1970); *W. Graf, H. Berner, L. Berner-Fenz, E. Gössinger, R. Imhof & H. Wehrli*, Helv. 53, 2267 (1970).
- [6] *E. Gössinger, W. Graf, R. Imhof & H. Wehrli*, Helv. 54, 2785 (1971).
- [7] *W. Graf, E. Gössinger, R. Imhof & H. Wehrli*, Helv. 54, 2789 (1971).
- [8] *I. L. Karle & J. Karle*, Acta crystallogr. B25, 428 (1969).
- [9] *L. A. Carpino*, J. org. Chemistry 35, 3971 (1970).
- [10] *J. D. Albright & L. Goldman*, J. Amer. chem. Soc. 89, 2416 (1967).

<sup>8</sup>) A generous gift of natural batrachotoxinin A (**23**) by Professor Dr. *B. Witkop*, National Institutes of Health, Bethesda/USA, is gratefully acknowledged.

<sup>9</sup>) The NMR. spectrum for both natural<sup>8</sup>) and synthetic batrachotoxinin A is as follows:  $\delta = 0.88/s$   $\text{CH}_3$ -19,  $1.40/d/J = 7$   $\text{CH}_3$ -21, ca.  $2.00\text{--}4.20$ /several *m*  $\text{CH}_2$ -1' +  $\text{CH}_2$ -2',  $2.32 + 3.21/2d/J_{15,15} = 19$  (further splitting by  $J_{15,16} = 2$ )  $\text{CH}_2$ -15,  $2.35/s$   $\text{NCH}_3$ ,  $2.71/s$   $\text{CH}_2$ -18,  $3.78/d/J_{11,12\alpha} = 9$  (further splitting by  $J_{11,12\beta} = 4$ )  $\text{CH}$ -11,  $4.46/q/J = 7$   $\text{CH}$ -20,  $5.66/t/J = 2$   $\text{CH}$ -16,  $6.24/d/J_{6\beta,7} = 6$  (further splitting by  $J_{6\alpha,7} = 2$ )  $\text{CH}$ -7 ( $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ), somewhat different from the original description [4].

## 117. Le blocage de la lysine par la réaction de Maillard

### II. Propriétés chimiques des dérivés N-(désoxy-1-D-fructosyl-1) et N-(désoxy-1-D-lactulosyl-1) de la lysine

par **P. A. Finot** et **J. Mauron**

Département Recherche et Développement de la Société d'Assistance Technique pour Produits Nestlé S.A., La Tour de Peilz, Suisse

(7. 3. 72)

*Summary.* Lysine is often inactivated by 'Maillard-type' reactions in food proteins; the values obtained for it by different methods cannot be compared because the chemical behaviour of inactivated lysine is unknown. In this paper, the behaviour of an important form of inactivated lysine, namely its 1-deoxyketosyl derivatives, during acid hydrolysis as well as on the different assays for available lysine (F-DNB, TNBS, pipsylchloride and guanidination) is studied. The relative proportions of regenerated lysine and of formed furosine and pyridosine are established as a function of the conditions of hydrolysis. The validity of the methods used to estimate available lysine from its 1-deoxyketosyl derivatives is discussed.

Grâce à la synthèse spécifique des dérivés désoxyfructosylés et désoxylactulosylés de la lysine en  $N_\alpha$  et  $N_\epsilon$  que nous avons décrite [1], nous avons pu en préparer des quantités suffisantes pour étudier leur comportement chimique et biologique. Ce sont, en effet, des composés stables en absence d'humidité.

Dans ce mémoire, nous en décrivons certaines propriétés chimiques qui influencent directement l'analyse de la lysine dans les aliments. On sait, en effet, qu'une partie de la lysine qui devient biologiquement non disponible dans les aliments surchauffés y est présente sous forme de dérivés désoxycétosylés (produits d'*Amadori*).

Il est donc de première importance de savoir comment se comportent ces dérivés au cours des divers procédés proposés pour doser la teneur et la disponibilité de la lysine dans les aliments.

**1. Comportement à l'hydrolyse acide.** – Pour déterminer la teneur en lysine d'une protéine, on hydrolyse d'abord cette dernière avec un acide fort, généralement l'acide chlorhydrique. Il fallait donc étudier le comportement à l'hydrolyse acide des produits d'*Amadori* de la lysine, car une étude systématique n'avait encore été faite qu'avec ceux d'autres acides aminés et les rares résultats obtenus étaient fort divergents. Ainsi, *Gottschalk* [2], trouve un taux de régénération de 26% pour le dérivé désoxycétosylé de la phénylalanine, et *Chichester* [3], un taux de 50% pour le dérivé de la glycine. Les auteurs sont cependant d'accord sur la destruction complète de l'ose.

Nous avons étudié sous cet angle les dérivés d'*Amadori* suivants:

$N_\alpha$ -(désoxy-1-D-fructosyl-1)-L-lysine	ou $\alpha$ -DF-Lys
$N_\epsilon$ -(désoxy-1-D-fructosyl-1)-L-lysine	ou $\epsilon$ -DF-Lys
$N_\alpha, N_\epsilon$ -di-(désoxy-1-D-fructosyl-1)-L-lysine	ou di-DF-Lys
$N_\alpha$ -formyl- $N_\epsilon$ -(désoxy-1-D-fructosyl-1)-L-lysine	ou $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys
$N_\alpha$ -formyl- $N_\epsilon$ -(désoxy-1-D-lactulosyl-1)-L-lysine	ou $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DL-Lys

Les hydrolyses ont été faites dans HCl 6N à reflux selon les conditions de *Dustin* [4] employées couramment pour l'hydrolyse des protéines alimentaires; elles ont été faites aussi en tube scellé, en absence et en présence de sucres réducteurs, pour vérifier une perte éventuelle de lysine par formation d'humines (*Sentheshammuganathane*) [5], ainsi que dans HCl 7,75N à reflux selon *Erbersdobler* [6] [7] (tab. 1 et 2). La lysine régénérée a été dosée par chromatographie sur échangeurs d'ions selon *Spackman* [8].

L'analyse des résultats montre que:

- Le taux de lysine régénérée n'est pas le même selon que le blocage a lieu sur l'amine en  $\alpha$ , sur l'amine en  $\epsilon$  ou sur les deux à la fois. Il est intéressant de remarquer que le taux de récupération de la lysine à partir du dérivé doublement bloqué est égal au produit des taux respectifs de récupération à partir des dérivés substitués en  $N_\alpha$  et  $N_\epsilon$ .
- Le taux de régénération de la lysine à partir des  $N_\epsilon$ -désoxycétosyl-lysines (ceux dérivant du glucose aussi bien que du lactose) n'est affecté ni par la technique d'hydrolyse (à reflux ou en tube scellé), ni par la présence de sucres réducteurs dans le milieu d'hydrolyse, ni par la concentration du substrat ni même par la durée du stockage de ces dérivés. Seule la concentration de l'acide utilisé pour l'hydrolyse

Tableau 1. *Influence de la durée de conservation et des conditions d'hydrolyse des dérivés désoxycétosylés de la lysine sur son taux de régénération par hydrolyse dans HCl 6N*  
(durée des hydrolyses: 18 à 24 h)

Echantillon	Conservation (mois)		Conditions d'hydrolyse		% de lysine régénérée
			Procédé	Conc. du substrat	
Di-DF-Lys	A	1	a)	1)	33,3–34,3
	B	1	a)	1)	37,6–38,7
$\alpha$ -DF-Lys	A	1	a)	1)	77,4–77,5
	B	1	a)	1)	77,0–78,0
$\epsilon$ -DF-Lys	A	1	a)	1)	49,6–55,1
			a)	1)	49,1–45,7
	B	1	a)	1) + glucose 2 mg/ml	48,3
			a)	1) + glucose 4 mg/ml	48,9
			b)	1)	50,8–49,5
			b)	2)	50,7
			b)	2) + glucose 20 mg/ml	53,3
			a)	1)	53,8–54,1
	C	5	a)	1)	53,1
			a)	1)	54,9
a)			1)	54,9	
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys	A	30	a)	1)	41,1–48,6
	B	5	a)	1)	48,3–48,2–46,2
		30	a)	1)	48,7
		33	a)	1)	47,6
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DL-Lys	A	1	a)	1)	46,6–47,3
		18	a)	1)	53,3–53,5–48,5
	B	5	a)	1)	49,5–53,1

Tableau 2. *Taux de lysine régénérée à partir des dérivés  $\epsilon$ -désoxycétosylés de la lysine par hydrolyse acide dans HCl 7,75N*  
(conditions d'Erbersdobler [6] [7])

Echantillon	Conservation (mois)	% de lysine régénérée	
$\epsilon$ -DF-Lys	C	30	46,4
		33	44,2
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys	B	30	41,9
		33	42,8

Tableau 3. *Influence de la concentration de l'acide chlorhydrique sur le taux de régénération de la lysine par hydrolyse acide de ses dérivés  $\epsilon$ -désoxycétosylés*

Echantillon	% de lysine régénérée	
	HCl 6N	HCl 7,75N
$\epsilon$ -DF-Lys	51,2 $\pm$ 1,5	45,3
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys	46,95 $\pm$ 2,0	42,35
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DL-Lys	50,3 $\pm$ 2,3	
moyenne	49,5 $\pm$ 2,6	43,8 $\pm$ 2,0

affecte le taux de régénération qui est de  $49,5 \pm 2,6\%$  pour HCl 6N et de  $43,8 \pm 2,0\%$  pour HCl 7,75N. Etant donné la constance de ces valeurs, elles pourraient être employées à des fins analytiques (tab. 3).

Nous pouvons conclure que lorsque la lysine est présente dans un aliment sous forme de son dérivé d'*Amadori*, elle n'apparaîtra dans le dosage classique, à savoir après hydrolyse acide dans HCl 6N, qu'à moitié comme lysine, le reste étant détruit. Il s'ensuit que le dosage de la lysine par hydrolyse acide, dans une protéine contenant cette dernière sous forme désoxycétosylée sera entaché d'une double erreur. La valeur trouvée ne correspondra, ni à toute la lysine théorique présente, ni à la lysine non désoxycétosylée. Il s'agit donc d'une valeur hybride, appelée parfois lysine totale (*Roach* [9]), c'est-à-dire la lysine trouvée dans un hydrolysats acide d'une protéine. Dans une protéine native, cette lysine dite totale équivaut à la lysine théorique.

Il a été montré que la présence de lysine sous forme désoxycétosylée dans une protéine peut être décelée par l'apparition dans l'hydrolysats acide, de deux témoins: la furosine (*Brüggemann* [10], *Heyns* [11], *Finot* [12]) et la pyridosine (*Finot* [13]). Ce sont là deux formes de la lysine détruite qui ont été longtemps ignorées. L'hydrolyse de désoxycétosyl-lysines pures nous a permis de déterminer le taux de formation

Tableau 4. Formation de la furosine et de la pyridosine par hydrolyse acide des  $N_\epsilon$ -désoxycétosyl-lysines

Echantillon		conservation (mois)	rapport des surfaces des pics chromatographiques		
			furosine/ lys. régén.	pyridosine/ lys. régén.	
A. Hydrolyse dans HCl 6N					
$\epsilon$ -DF-Lys	C	5	0.394	0.218	
			0.393	0.206	
		30	0.443		
		33	0.425	0.185	
D	2		0.371		
			0.387		
			0.388		
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys	B	5	0.429	0.209	
			0.398	0.212	
		30	0.398		
		33	0.434	0.216	
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DL-Lys	A	18	0.458		
				0.394	
				0.380	
	B	5		0.430	
				0.417	0.223
			0.403	0.201	
B. Hydrolyse dans HCl 7,75N					
$\epsilon$ -DF-Lys	C	30	0.627		
		33	0.665	0.242	
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys	B	30	0.703		
		33	0.680	0.279	

de chacun de ces deux dérivés. Ceux-ci ont été séparés par chromatographie sur échangeurs d'ions selon la méthode décrite par *Finot* [13]. Mais étant donné la difficulté d'obtenir la furosine et la pyridosine dans un état de pureté satisfaisante et par conséquent de calculer exactement le facteur pour leur dosage colorimétrique précis, nous avons préféré exprimer les résultats sous forme des rapports des surfaces des pics chromatographiques obtenus, furosine/lysine régénérée et pyridosine/lysine régénérée. Les facteurs colorimétriques de la furosine et de la pyridosine ont quand même été mesurés sur les échantillons que nous avons à disposition; ces facteurs seraient respectivement à peu près de 10% et de 20% plus bas que celui de la lysine.

Tableau 5. Valeurs moyennes des rapports des surfaces furosine/lysine régénérée et pyridosine/lysine régénérée obtenus dans les hydrolysats acides des  $N_{\epsilon}$ -désoxycétosyl-lysines

Echantillon	furosine/ lysine régénérée		pyridosine/ lysine régénérée	
	HCl 6N	HCl 7,75N	HCl 6N	HCl 7,75N
$\epsilon$ -DF-Lys	0,40 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,02	0,242
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys	0,42 $\pm$ 0,02	0,69 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	0,279
$\alpha$ -F- $\epsilon$ -DL-Lys	0,40 $\pm$ 0,02		0,21 $\pm$ 0,02	
Moyennes	0,41 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,03

Il ressort de ces résultats présentés dans les tab. 4 et 5 que le taux de formation de la furosine et de la pyridosine est le même pour le dérivé  $N_{\epsilon}$  du lactose que pour celui du glucose, et que ce taux n'est pas affecté par la formylation du groupement aminé. Le taux de formation de la furosine à partir de la  $N_{\epsilon}$ -désoxyfructosyl-lysine varie cependant avec la normalité de l'acide utilisé pour l'hydrolyse. Selon *Erbersdobler* [7] ce taux est maximum quand l'hydrolyse est faite dans HCl 7,75N.

Connaissant le taux de lysine régénérée ainsi que le rapport des surfaces furosine/lysine régénérée et pyridosine/lysine régénérée on peut calculer le taux de désoxycétosyl-lysine transformée respectivement en furosine et en pyridosine, dans les conditions d'hydrolyse normale (HCl 6N) ainsi que dans les conditions d'*Erbersdobler* (HCl 7,75N) en supposant leurs facteurs colorimétriques égaux à celui de la lysine (tab. 6).

Tableau 6. Calcul du pourcentage de  $N_{\epsilon}$ -désoxycétosyl-lysine transformée respectivement en furosine et en pyridosine à l'hydrolyse acide

Conditions d'hydrolyse	% lysine régén.	furosine/lysine		pyridosine/lysine	
		rapport des surfaces	correspondant à % de la lysine	rapport des surfaces	correspondant à % de la lysine
HCl 6N	49,5	0,41	20,3	0,21	10,4
HCl 7,75N	43,8	0,67	29,3	0,26	11,4

La normalité de l'acide utilisé pour l'hydrolyse influe passablement sur le taux de formation de la furosine, mais pratiquement pas sur celui de la pyridosine.

Il est évident que dans une protéine qui a subi une réaction du type *Maillard*, la lysine dosable après hydrolyse acide (lysine dite totale) n'est pas égale à la lysine

disponible pour l'organisme. C'est pourquoi, des méthodes chimiques ont été développées pour essayer de doser la lysine biologiquement disponible. Elles sont toutes basées sur l'hypothèse que pour que la lysine soit disponible *in vivo*, son groupe  $\varepsilon$ -amino doit être intact (lysine intacte). Il était donc de première importance de connaître le comportement de la lysine bloquée sous forme désoxycétosylée dans les procédés proposés pour le dosage de la lysine disponible.

**2. Comportement dans les dosages de la lysine disponible.** – Un dérivé de la lysine à groupement  $\varepsilon$ -amino libre peut réagir avec des réactifs «spécifiques» tels que le fluorodinitrobenzène ou F-DNB (*Carpenter* [14]), l'acide trinitrobenzène-sulfonique ou TNBS (*Kakade* [15]), le chlorure de pipsyle (*Oratz* [16]) ou l'O-méthylisourée (*Bujard* [17]). La lysine qui réagit avec chacun de ces réactifs et qui est dosée respectivement sous la forme d' $\varepsilon$ -DNP-lysine, d' $\varepsilon$ -TNP-lysine, d' $\varepsilon$ -pipsyl-lysine ou d'homoarginine est appelée disponible. C'est ici qu'intervient l'importance de la spécificité des réactifs vis-à-vis du groupement  $\varepsilon$ -amino libre de la lysine. Nous avons contrôlé cette spécificité dans le cas des  $N_\varepsilon$ -désoxycétosyl-lysines et nous avons pu démontrer qu'elle n'existait pas pour tous les réactifs. Le comportement de chacun de ces derniers est étudié dans les paragraphes qui suivent:

2.1. *F-DNB: Dosage de Carpenter.* – Il a toujours été admis que la lysine détériorée ne réagissait plus au F-DNB (*Carpenter* [14], *Heyns* [18]) et l'expérience a montré, en effet, qu'il existait une bonne concordance entre les valeurs de lysine disponible données par cette méthode ( $d_{\text{CAR}}$ ) et celles mesurées soit par méthode biologique ( $d_{\text{B}}$ ) à partir d'un test de croissance sur animaux (*Mottu* [19]) soit par une méthode conventionnelle mais à partir d'un hydrolysate enzymatique ( $d_{\text{E}}$ ) de la protéine (*Bujard* [20]):

$$d_{\text{E}} = 0,92 d_{\text{CAR}} + 0,86 \text{ (Bujard [20])}$$

$$d_{\text{B}} = 0,94 d_{\text{CAR}} + 0,61 \text{ (Mottu [19])}.$$

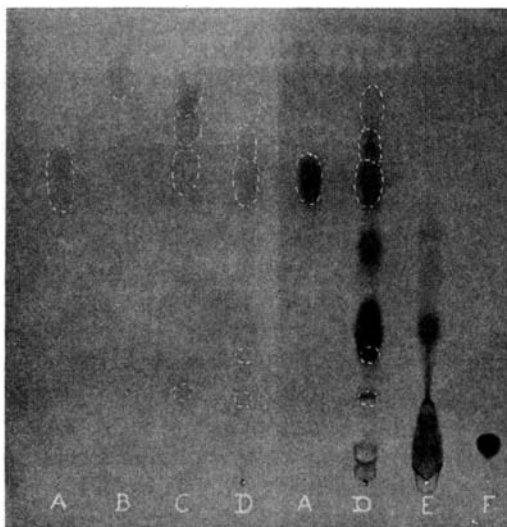
La méthode de *Carpenter* dose donc la même chose que les deux autres méthodes, mais si on la regarde de plus près, l'on peut trouver beaucoup de causes d'erreurs telles que, l'inaccessibilité de certains groupements amino au F-DNB, la réduction des groupements  $-\text{NO}_2$  de la  $N_\varepsilon$ -DNP-lysine par les sucres réducteurs pendant l'hydrolyse (*Handwerck* [21]) et les «artefacts» de la réaction, qui peuvent être nombreux car beaucoup de substances réagissent au F-DNB. Des modifications ont en effet été apportées à la méthode originale de *Carpenter*, destinées à supprimer ou à limiter les causes d'erreur; parmi ces modifications, citons celle de *Rao* [22], dans laquelle la  $N_\varepsilon$ -DNP-lysine est dosée après séparation chromatographique, et celle de *Roach* [9], dans laquelle la lysine disponible est calculée comme étant la différence entre la lysine totale et la lysine retrouvée après hydrolyse de la protéine dinitro-phénylée. Les résultats obtenus par ces trois méthodes au F-DNB diffèrent entre eux (*Roach* [9]), et ces différences ne sont pas complètement explicables au vu de nos connaissances actuelles de la structure et des propriétés chimiques de la lysine non disponible.

En plus des phénomènes déjà mentionnés susceptibles de fausser les résultats de la méthode au F-DNB, deux autres causes d'erreurs peuvent interférer dans l'évaluation de la lysine disponible par ce réactif: la possibilité que d'un côté certaines formes chimiques de lysine disponible ne réagissent pas avec le F-DNB, et que de l'autre

certaines formes de lysine non-disponible réagissent avec ce corps. Seule la seconde de ces possibilités sera étudiée dans ce travail.

La réactivité du F-DNB a été examinée sur deux dérivés  $N_{\alpha}$ -formyl- $N_{\epsilon}$ -désoxycétosyl-lysines déjà décrits (*Finot* [1]). La  $N_{\alpha}$ -formyl- $N_{\epsilon}$ -(désoxy-1-D-fructosyl-1)-L-lysine ( $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys) et la  $N_{\alpha}$ -formyl- $N_{\epsilon}$ -(désoxy-1-D-lactulosyl-1)-L-lysine ( $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DL-Lys) ont été traitées par le F-DNB dans les conditions du dosage de la lysine disponible selon *Carpenter* [14]. Dans chaque cas, il s'est formé un précipité jaune insoluble dans l'éther, mais soluble dans l'acétone et le butanol. Ce précipité n'était pas du dinitrophénol. On a vérifié par ailleurs que les groupements amino formylés ne réagissaient pas avec le F-DNB. Ces observations nous conduisent donc à admettre une réaction entre le F-DNB et le résidu  $N_{\epsilon}$ -amino-désoxycétosylé du dérivé de la lysine.

La chromatographie sur couche mince de cellulose de ce produit dinitrophénylé sépare trois fractions majeures jaunes, visibles en ultra-violet, et non réactives à la ninhydrine (v. fig.). L'existence de trois produits de réaction nous amène à conclure que le F-DNB peut se fixer sur plusieurs fonctions réactives de la molécule. L'hypothèse la plus vraisemblable serait que le F-DNB peut se fixer sur l' $N_{\epsilon}$  de la lysine, ainsi que sur l'hydroxyle de la forme énol du reste désoxycétosylé (v. schéma); de cette façon, on pourrait obtenir deux dérivés mono-dinitrophénylés et un dérivé bis-dinitrophénylé. La structure chimique des dérivés dinitrophénylés obtenus n'a pas pu être déterminée à cause de l'impossibilité de les transformer en corps volatils pour leur analyse en spectrographie de masse. L'hydrolyse acide du mélange dinitro-



Chromatographie sur couche mince de cellulose (Macherey & Nagel, MN 300) d'une solution de l' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys dinitrophénylée.

Les taches en pointillés sont visibles en ultraviolet. Les taches foncées réagissent à la ninhydrine.  
Solvant: Butanol/acide acétique/eau 4:1:1 (vol.)

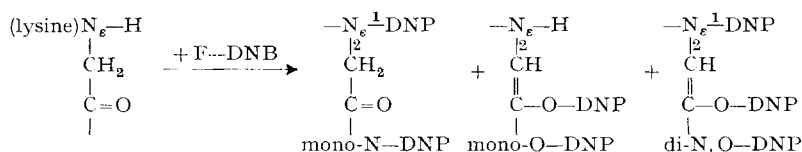
C avant hydrolyse; D extrait butanolique, E phase aqueuse, après hydrolyse acide; A  $N_{\epsilon}$ -DNP-Lys; B DNP-OH; F lysine.

phénylé nous permet de tirer cependant quelques indications quant à leur structure. La chromatographie sur couche mince de cellulose de l'hydrolysats (v. fig.) sépare trois composés dinitrophénylés dont deux réagissent à la ninhydrine, et deux composés non dinitrophénylés réagissant les deux à la ninhydrine.

Parmi les trois composés dinitrophénylés, on a pu identifier la N<sub>ε</sub>-DNP-lysine, et parmi les deux dérivés non dinitrophénylés, on a pu identifier la lysine. Le mécanisme de la libération de la lysine et de la N<sub>ε</sub>-DNP-lysine à partir de la forme désoxycétose dinitrophénylée est expliqué dans le schéma suivant.

*Réactions hypothétiques du F-DNB avec une désoxycétosyl-lysine et comportement des dérivés dinitrophénylés à l'hydrolyse acide.*

Réaction avec le F-DNB:



Hydrolyse acide

- a) Mono-N-DNP: coupure de la liaison 2 → N<sub>ε</sub>-DNP-lysine  
coupure des liaisons 1 + 2 → lysine\*)
- b) Mono-O-DNP: coupure d'autres liaisons → composés inconnus  
coupure de la liaison 2 → lysine\*)
- c) di-N-O-DNP: coupure d'autres liaisons → composés inconnus  
coupure de la liaison 2 → N<sub>ε</sub>-DNP<sup>2</sup>-lysine  
coupure des liaisons 1 + 2 → lysine\*)  
coupure d'autres liaisons → composés inconnus

La présence de N<sub>ε</sub>-DNP-lysine et de lysine dans l'hydrolysats acide des dinitrophényl-désoxycétosyl-lysines est lourde de conséquences pour la validité des dosages de la lysine disponible selon *Carpenter* [14] et *Roach* [9]: ces méthodes sont entachées d'erreurs du fait de ces réactions insoupçonnées jusqu'ici; ce que ces dosages déterminent comme lysine disponible comprend en effet une certaine partie, parfois importante, de lysine non disponible. Le pourcentage de lysine dosée comme disponible à partir des désoxycétosyl-lysines dérivés du glucose et du lactose, a été déterminé sur plusieurs échantillons (tab. 7). La partie de lysine dosée comme disponible est plus grande pour les dérivés du glucose que pour ceux du lactose; dans ce second cas, la libération au cours de l'hydrolyse, de galactose capable de réduire les groupes nitro pourrait expliquer les valeurs plus basses.

La méthode de *Carpenter* devrait donc fournir un chiffre trop grand pour la lysine disponible dans les protéines où elle est inactivée essentiellement sous la forme désoxycétosylée. En fait, tel n'est pas le cas: dans les laits surchauffés, le dosage de *Carpenter* donne des résultats voisins de ceux de la digestion *in vitro* (*Bujard* [20]) et aussi de ceux de la méthode biologique *in vivo* (*Mottu* [19]). Cela s'explique peut-être comme suit: les pertes de N<sub>ε</sub>-DNP-lysine pendant l'hydrolyse acide compenseraient la production de N<sub>ε</sub>-DNP-lysine à partir de la désoxyfructosyl-lysine. Dans le

\*) La lysine régénérée après hydrolyse acide du dérivé dinitrophénylé correspond à 6–10% de la lysine mise en œuvre.



Tableau 7. Lysine disponible dosée dans les  $N_\alpha$ -formyl-désoxycétosyl-lysines dérivées du glucose et du lactose, par différentes méthodes chimiques

Réactif	Auteur	Dérivé désoxy- cétosylé obtenu à partir de	lysine disponible % de la lysine mise en œuvre	déterminée sous forme de
F-DNB	<i>Carpenter</i>	glucose	25–28 14–19	$\epsilon$ -DNP-Lys
		lactose	10,2 6,2	
TNBS	<i>Kakade</i>	glucose	82–89	$\epsilon$ -TNP-Lys
Chlorure de pipsyle	<i>Oratz</i>	glucose	77–89	$\epsilon$ -pipsyl-Lys
O-méthyl-isouréc	<i>Bujard</i>	glucose	0	homoarginine

cas des protéines riches en sucres réducteurs, la méthode de *Carpenter* doit donc être employée avec circonspection; il semble que ce soit par hasard que les valeurs obtenues par cette méthode correspondent à celles obtenues par la méthode biologique *in vivo* et la méthode de digestion *in vitro*.

2.2. *La méthode de Roach* [9] a ceci de particulier qu'un dosage de lysine est substitué à un dosage de  $N_\epsilon$ -DNP-lysine après dinitrophénylation. Le principe de la méthode est basé sur l'idée suivante: la lysine retrouvée après hydrolyse acide de la protéine dinitrophénylée est identique à la fraction de lysine régénérée à partir de la lysine inactivée. Le calcul se fait comme suit: lysine disponible = lysine après hydrolyse acide de la protéine – lysine régénérée après hydrolyse acide de la protéine dinitrophénylée.

Le principe de cette méthode est théoriquement irréprochable, mais il est mis en défaut par les expériences faites sur les substances modèles.

Comme nous l'avons vu plus haut (tab. 1 et 3), 50% de la lysine inactivée sous forme désoxycétosylée est régénérée par hydrolyse acide. De plus, nous avons montré que 6 à 10% de la désoxyfructosyl-lysine dinitrophénylée régénèrait la lysine par hydrolyse acide. Dans le cas du lait, par exemple, où la forme désoxycétosylée est prédominante, 40 à 44% (soit 50%–6 à 10%) de la lysine inactivée sous cette forme serait dosée comme lysine disponible. Aussi cette méthode doit être utilisée avec circonspection dans le cas de protéines riches en sucres réducteurs.

2.3. *Acide trinitro-2,4,6-benzènesulfonique*. – Cet acide a été décrit comme étant plus spécifique que le F-DNB vis-à-vis des groupements amino libres des protéines et a été utilisé par *Kakade* [15] pour doser la lysine disponible. Nous avons aussi traité l' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys dans les conditions décrites par *Kakade* pour le dosage de la lysine disponible. La  $N_\epsilon$ -TNP-lysine mesurée par cette méthode correspond à 85% de la lysine «détériorée» mise en œuvre (tab. 7). Cette méthode est donc moins spécifique que celle de *Carpenter* et l'on peut conclure qu'elle est inapplicable aux produits riches en désoxycétosyl-lysines.

2.4. *Chlorure de pipsyle*. – Le chlorure de l'acide p-iodobenzènesulfonique (chlorure de pipsyle) a été proposé par *Oratz* [16] pour doser les groupements  $\epsilon$ -amino libres

de la lysine dans les protéines. Ce réactif n'a cependant jamais été utilisé pour doser la lysine disponible dans les protéines alimentaires.

Comme le précédent, ce réactif ne peut pas être utilisé dans ce but, car il réagit très fortement avec les désoxycétosyl-lysines et fournit, après hydrolyse acide 77% à 86% de N<sub>ε</sub>-pipsyl-lysine (tab. 7).

2.5. *O*-méthyl-isourée: *guanidination*. – L'*O*-méthyl-isourée réagit en milieu alcalin avec le groupement ε-amino libre de la lysine en le transformant en reste guanidine de l'homoarginine. Cette réaction a été suggérée par *Bujard* [17] pour doser la lysine disponible dans les protéines.

L'α-F-ε-DF-Lys, successivement dinitrophénylée puis hydrolysée en milieu acide, n'a pas donné d'homoarginine. Ce résultat nous permet de conclure qu'une N<sub>ε</sub>-désoxycétosyl-lysine n'est pas dosée comme lysine disponible par la méthode de guanidination. Dans les conditions utilisées, le rapport furosine/lysine était le même que pour l'α-F-ε-DF-Lys soumise directement à l'hydrolyse acide.

Tableau 8. *Comparaison de la spécificité des différentes méthodes de dosage de lysine disponible vis-à-vis des N<sub>ε</sub>-désoxycétosyle-lysines*

Méthode	Pourcentage de lysine dosée comme disponible à partir de lysine à fonction ε-amino libre	N <sub>ε</sub> -désoxycétosyl-lysine
hydrolyse acide	100	49.5
<i>Carpenter</i>	100	14 à 28 (glucose) 7 à 10 (lactose)
<i>Roach</i>	100	40 à 44
digestion <i>in vitro</i>	100	0
guanidination	100	0

La méthode de guanidination semble donc être la meilleure pour le dosage de la lysine «disponible» ou plutôt de la lysine «intacte», c'est-à-dire de la lysine dont le groupement ε-amino est resté libre; vient ensuite la méthode de *Carpenter*, les deux autres méthodes n'étant pas utilisables.

La méthode de *Carpenter* ne donnant pas satisfaction quand elle est appliquée à certaines substances modèles, nous voulons attirer l'attention sur l'importance de sa standardisation et du choix du facteur de correction à appliquer; à ces conditions elle gardera l'immense avantage sur la méthode de guanidination d'être rapide et utilisable en grande série.

**Conclusions.** – Seule l'étude précise du comportement chimique de dérivés bien définis de la lysine présents dans les aliments chauffés permet l'évaluation sûre de la validité des méthodes analytiques employées pour le dosage de la lysine disponible dans les aliments. Une première contribution est faite ici par l'étude du comportement chimique du principal produit de la réaction de *Maillard*.

Le comportement *in vivo* de ce composé fera l'objet du prochain mémoire de cette série.

## Partie expérimentale

*Produits utilisés.* – Les synthèses des dérivés de la lysine utilisés ont été décrites par *Finot et al.* [1]. Pour les hydrolyses on a employé l'acide chlorhydrique *Merck* (Darmstadt) à 37%, densité 1,19, considéré pour les dilutions comme étant 12N.

*Conservation des dérivés désoxycétylés de la lysine:* Dans un dessiccateur contenant NaOH en grains.

*Dosage de la lysine, de la furosine et de la pyridosine.* – Après hydrolyse acide des dérivés désoxycétylés de la lysine, la solution est évaporée sous vide. Le résidu est dissous dans du tampon citrate 0,2M de pH 2,2. Dans une partie aliquote de la solution la lysine, la furosine et la pyridosine sont séparées par chromatographie sur échangeurs d'ions à l'aide d'un auto-analyseur. La lysine et la furosine sont dosées par la méthode standard de séparation des acides aminés basiques selon *Spackman* [8] dont une variante selon *Finot et al.* [13] est appliquée au dosage de la pyridosine.

*Dosage de la lysine selon Carpenter.* – 40 à 50 mg d' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys ou d' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DL-Lys sont dissous dans 8 ml d'une solution aqueuse à 8% de NaHCO<sub>3</sub>. Après 10 min. on ajoute une solution de 0,3 ml de fluoro-1-dinitro-2,4-benzène dans 12 ml d'éthanol à 96%. Après 2 h d'agitation à température ordinaire et à l'abri de la lumière, on évapore le solvant sur bain-marie bouillant. Le résidu est hydrolysé à reflux pendant 18 h dans 100 ml d'HCl 6N. L'hydrolysât refroidi 2 h à 0° est filtré sur papier. On complète le volume du filtrat à 500 ml et le dosage est fait sur 2 ml de cette solution selon la méthode au chloroformiate de méthyle [14]. Le facteur de correction de 1,09 a été pris pour tous les échantillons.

*Méthode à l'acide trinitro-2,4,6-benzènesulfonique (TNBS).* – A 1 ml de solutions hydrogéné-carbonatées (4%) contenant respectivement 5, 10, 15 et 20  $\mu$ moles d' $\alpha$ -F-Lys et d' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys on ajoute 1 ml d'une solution fraîchement préparée à 0,1% de TNBS. Après 2 h de réaction à 40°, on ajoute 3 ml d'HCl concentré et chauffe les solutions en tube scellé, 1 h à 120°. Après refroidissement, chaque hydrolysât est dilué par 5 ml d'eau et extrait 2 fois à l'éther. On élimine l'éther résiduel de la phase aqueuse en plaçant les tubes dans un bain d'eau chaude et mesure la densité optique à 346 nm contre un blanc préparé avec 1 ml d'une solution d'hydrogénécarbonate à 4% + 1 ml de la solution de TNBS, mélange traité de la même manière que les autres échantillons. On calcule le taux de lysine disponible dans l' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys d'après la densité optique des échantillons en faisant, pour chaque dilution, la moyenne des rapports des densités optiques des échantillons contenant respectivement l' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys et l' $\alpha$ -F-Lys, l' $\alpha$ -F-Lys étant prise comme étalon de lysine disponible (100% de lysine disponible).

*Méthode au chlorure de l'acide iodo-benzènesulfonique (chlorure de pipsyle).* – A 2 ml de solutions contenant respectivement 50  $\mu$ moles d' $\alpha$ -F-Lys et d' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys on ajoute 1,5 ml d'une solution hydrogénécarbonatée à 8% puis 1 ml d'une solution de chlorure de pipsyle à 50 mg/ml dans le dioxanne. Après 30 min. de réaction à 40° sous agitation, 2 ml d'HCl 6N sont ajoutés pour arrêter la réaction, puis 6,5 ml d'HCl concentré pour l'hydrolyse. Celle-ci est faite en tube scellé à 110° pendant 24 h. Après évaporation à sec de l'hydrolysât, le résidu est repris par 5 ml d'eau chaude. On dépose une fraction de 0,2 ml de cette solution sur une colonne de Dowex-50 WX4 équilibrée avec un tampon citrate de sodium 0,1M de pH 6,0 (h = 15 cm,  $\varnothing$  = 0,9 cm). La chromatographie est faite à 60° avec le tampon d'équilibration sous un débit de 12 ml/h. L'absorption à 250 nm est mesurée en continu sur un photomètre *Vitaltron*. Les fractions correspondantes au pic de N<sub>6</sub>-pipsyl-lysine sont rassemblées et ajustées au même volume, et leurs densités optiques sont lues à 250 nm sur un photomètre *Beckman* DB-G. La lysine disponible mesurée par cette méthode dans l' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys est calculée sur la base de ces lectures, l' $\alpha$ -F-Lys étant prise comme étalon (100% de lysine disponible).

*Guanidination.* – A 20 ml d'une solution aqueuse de 250  $\mu$ moles d' $\alpha$ -F- $\epsilon$ -DF-Lys on ajoute 20 ml de tampon phosphate 0,05M de pH 10,5 et 5 ml d'une solution contenant 500  $\mu$ moles de O-méthylisourée, préparée juste avant l'emploi par réaction de sulfate acide d'O-méthylisourée obtenu selon *Fearing* [23] avec une quantité équimoléculaire d'hydroxyde de baryum, suivie d'une centrifugation. Le pH du mélange conservé durant 4 jours à 4–5° est corrigé journalièrement à 10,5; ensuite la solution est rendue 6N par HCl, puis chauffée à reflux pendant 18 h. Après évaporation de l'acide chlorhydrique, l'homoarginine est déterminée par chromatographie sur échangeurs d'ions selon *Spackman* [8].

Nous remercions *Melles G. Mayer et I. Verkleij* ainsi que *M. J. P. Corbaz* de leur collaboration technique, et *Melle E. Bujard* de sa contribution à l'analyse des acides aminés sur autoanalyseur.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] *P. A. Finot & J. Mauron*, *Helv.* **52**, 1488 (1969).  
 [2] *A. Gottschalk*, *Biochem. J.* **52**, 455 (1952).  
 [3] *C. O. Chichester, F. H. Statdman & G. Mackinney*, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 3418 (1952).  
 [4] *J. P. Dustin, C. Czajkowska, S. Moore & E. J. Bigwood*, *Analyt. chim. Acta* **9**, 256 (1953).  
 [5] *S. Sentheshanmuganathan & A. A. Hoover*, *Biochem. J.* **68**, 621 (1958).  
 [6] *H. Erbersdobler & H. Zucker*, *Milchwissenschaft*, **21**, 564 (1966).  
 [7] *H. Erbersdobler*, *Milchwissenschaft*, **25**, 280 (1970).  
 [8] *D. H. Spackman, W. H. Stein & S. Moore*, *Analyt. Chemistry* **30**, 1185 (1958).  
 [9] *A. G. Roach, P. Sanderson & D. R. Williams*, *J. Sci. Fd Agric.* **18**, 274 (1967).  
 [10] *J. Brüggemann & H. Erbersdobler*, *Z. Lebensmittel unters. Forschg.* **137**, 137 (1968).  
 [11] *K. Heyns, J. Heukeshoven & K.-H. Brose*, *Angew. Chem.* **80**, 627 (1968).  
 [12] *P. A. Finot, J. Bricout, R. Viani & J. Mauron*, *Experientia* **24**, 1097 (1968).  
 [13] *P. A. Finot, R. Viani, J. Bricout & J. Mauron*, *Experientia* **25**, 135 (1969).  
 [14] *K. J. Carpenter*, *Biochem. J.* **77**, 604 (1960).  
 [15] *M. L. Kakade & I. E. Liener*, *Analyt. Biochemistry* **27**, 273 (1969).  
 [16] *M. Oratz, A. L. Burks & M. A. Rothschild*, *Biochim. biophys. Acta* **115**, 88 (1966).  
 [17] *E. Bujard & J. Mauron*, *Proceedings of the 6th International Congress of Nutrition* p. 489, E. & S. Livingstone LTD. Edinburgh and London (1964).  
 [18] *K. Heyns & H. Paulsen*, *Wissenschaftliche Veröffentlichungen der deutschen Gesellschaft für Ernährung – 5. Symposium, München 1959*.  
 [19] *F. Mottu & J. Mauron*, *J. Sci. Fd Agric.* **18**, 57 (1967).  
 [20] *E. Bujard, V. Handwerck & J. Mauron*, *J. Sci. Fd Agric.* **18**, 52 (1967).  
 [21] *V. Handwerck, E. Bujard & J. Mauron*, *Biochem. J.* **76**, 54 P. (1960); *V. Handwerck, E. Bujard & J. Mauron*, *Helv.* **49**, 419 (1966).  
 [22] *S. R. Rao, F. L. Carter & V. L. Frampton*, *Analyt. Chemistry* **35**, 1927 (1963).  
 [23] *R. B. Fearing & S. W. Fox*, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 4382 (1954).

## 118. Phénylhalogénohydrodigermanes

par **Pierre Rivière** et **Jacques Satgé**

Laboratoire de chimie des Organominéraux. Université Paul Sabatier,  
31-Toulouse (France)

(27 XII 71)

*Abstract.* The symmetric and unsymmetric phenylchlorohydrodigermanes can be isolated or characterized via partial halogenation of the Ge–H bonds of the symmetrical phenylhydrodigermanes  $\text{Ph}_2(\text{H})\text{GeGe}(\text{H})\text{Ph}_2$ ,  $\text{Ph}(\text{H})_2\text{GeGe}(\text{H})_2\text{Ph}$  by chloromethyl methyl ether and carbon tetrachloride. Some of these phenylchlorohydrodigermanes are formed by insertion of phenylchlorogermylene ( $\text{PhGeCl}$ ) on the Ge–H or Ge–Cl bonds of the phenylchlorohydrodigermanes.

The hydrolysis of the monochloro phenylhydrodigermanes  $\text{Ph}_2(\text{Cl})\text{GeGe}(\text{H})\text{Ph}_2$  and  $\text{Ph}(\text{Cl})(\text{H})\text{GeGe}(\text{H})_2\text{Ph}$  leads to the phenyl phenylhydrogermyl digermoxanes  $[\text{Ph}_2(\text{H})\text{GeGePh}_2]_2\text{O}$  and  $[\text{Ph}(\text{H})_2\text{GeGe}(\text{H})\text{Ph}]_2\text{O}$ . Treatment of these oxides with the concentrated aqueous solutions of hydrazides leads to the monofluorinated, brominated and iodinated phenylhydrodigermanes  $\text{Ph}_2(\text{H})\text{GeGe}(\text{X})\text{Ph}_2$  and  $\text{Ph}(\text{H})_2\text{GeGe}(\text{H})(\text{X})\text{Ph}$  (X = F, Br, I).

Phenylchlorohydrodigermanes decompose thermally by  $\alpha$ -elimination on one germanium atom with formation of germylene and phenylchlorohydrogermane.

The physico-chemical IR. and NMR. study of these phenylhalogenohydrodigermanes indicates that, if the  $\nu\text{Ge-H}$  frequency variations are mostly linked to the inductive effects of the substituents on the same germanium, the variations of the chemical shifts of the Ge–H protons seem to be due to many factors and especially to the inductive effect of the substituents on the germanium and the magnetic anisotropy of the Ge–X bonds.