

LE DOSAGE PHOTOMÉTRIQUE DES NUCLÉOSIDES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES AU MOYEN DE LA RÉACTION A L'ORCINE

PAR

L. MASSART ET J. HOSTE

*Laboratoire de Chimie physiologique de l'Université de Gand (Ecole Vétérinaire)
et Laboratoire de la Fondation Van der Stricht, Gand (Belgique)*

Plusieurs auteurs ont essayé d'employer la réaction à l'orcine comme méthode quantitative pour le dosage des nucléosides et des nucléotides. Ainsi EMBDEN et LEHNARTZ¹ l'ont essayée pour doser l'acide adénylique du muscle et FERDMANN et FEINSCHMIDT² l'ont employée comme méthode colorimétrique pour le dosage des nucléotides. Les méthodes n'ont pas donné toute la satisfaction voulue. DISCHE et ZACHARIAS¹ à leur tour ne sont pas parvenus à établir une méthode quantitative. MEJBAUM⁴ a récemment publié une méthode qui paraît être bonne et simple. Enfin BARRENSCHEEN et PEHAM⁵ ont communiqué une méthode, qui est une modification de la réaction de BIAL (remplacement de FeCl_3 par CuCl_2), qui est très sensible et qui permet le dosage quantitatif par voie colorimétrique ou photométrique des nucléosides et des nucléotides.

Toutefois cette méthode permet seulement le dosage des nucléosides puriques, mais elle fait défaut pour la détermination des nucléosides pyrimidiques. Nous nous sommes appliqués à doser quantitativement les nucléosides pyrimidiques en présence des nucléosides puriques. Dans les conditions habituelles de la réaction à l'orcine les nucléosides pyrimidiques ne sont pas hydrolysés. Le traitement à l'eau de brome ou la réduction catalytique toutefois diminuent la résistance à l'hydrolyse (LEVENE¹). Nous avons profité de cette constatation de LEVENE pour rendre la méthode de BARRENSCHEEN applicable au dosage des nucléosides pyrimidiques.

Voici d'abord la technique suivie pour le dosage des nucléosides puriques d'après BARRENSCHEEN et PEHAM⁵. Les auteurs ont employé comme instrument de mesure le photomètre de LEITZ, filtre 620. Nous avons utilisé le photomètre de ZEISS, filtre 610.

Réactifs employés: 1. solution de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\frac{\text{M}}{2500}$ dans HCl pro analysi $d = 1,91$.

2. A partir de la solution 1, on prépare au moment des dosages une solution contenant 0,2 gr d'orcine pour 100 cm³ de la solution 1. Le réactif se conserve seulement quelques heures.

Dosage de pentoses pures et de nucléosides puriques purs. Des volumes égaux (nous employions toujours 3 cm³) de la solution 2 et de la solution à doser sont mélangés et portés pendant 10 minutes au bain marie bouillant énergiquement. On refroidit ensuite aussitôt que possible sous un filet d'eau courante. On lit l'extinction dans la cuvette de 1 cm.

Nous avons dosé ainsi le xylose, l'arabinose et l'adénosine, ainsi que l'acide

adénosine-triphosphorique avec les mêmes résultats que BARRENSCHEEN et PEHAM, savoir que les valeurs de l'extinction pour le xylose sont toujours légèrement supérieures à celles trouvées pour l'arabinose (cf. Tableau I). Nous avons constaté également des valeurs d'extinction sensiblement plus élevées pour l'adénosine (exprimée en pentose). Les valeurs sont encore plus grandes pour l'acide adénosinetriphosphorique, ce qui cadre très bien avec les résultats de BARRENSCHEEN et PEHAM.

Le Tableau I donne les valeurs de l'extinction pour les concentrations données.

Dosage des nucléosides pyrimidiques et puriques.

TABLEAU I

EXTINCTION D'ARABINOSE, XYLOSE ET ADÉNOSINE

Substance	Concentration en γ par cm^3	Concentration d'adénosine exprimée en pentose en γ par 6 cm^3	Extinction
Xylose	50		0,16
	100		0,25
	200		0,45
	300		0,63
Arabinose	50		0,11
	100		0,21
	200		0,41
	300		0,60
Adénosine	50	28,9	—
	100	57,8	0,16
	200	115,6	0,30
	300	173,4	0,43

La méthode d'hydrolyse employée dans la méthode de BARRENSCHEEN et PEHAM ne suffit toutefois pas pour hydrolyser les nucléosides pyrimidiques, même après traitement par le brome. Ce traitement présente d'ailleurs un certain danger. Si on laisse agir le brome trop longtemps les résultats sont complètement faussés par suite

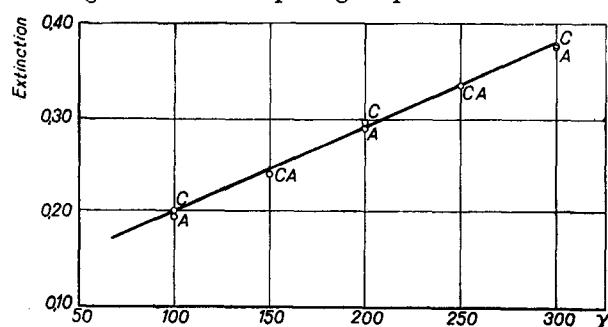


Fig. 1. Extinction d'adénosine et de cytidine.

de la disparition de la coloration. Après maints essais nous avons adopté la méthode suivante, qui nous a donné des résultats reproductibles aussi bien pour l'adénosine que pour la citydine *.

La solution contenant les nucléosides (nous avons toujours employé 3 cm^3) est additionnée de $0,01 \text{ cm}^3$ de brome et portée dans un bain d'huile

* Nous remercions M. FLORKIN d'avoir mis cette substance à notre disposition.

Bibliographie p. 86.

gardé à la température de 105° et agité par un agitateur en verre mu par un moteur. Après 2 minutes l'excès de brome est chassé par un courant d'air, puis la solution est remplacée au bain d'huile pendant 38 minutes (cette durée et cette température suffisent pour hydrolyser les nucléosides pyrimidiques). Au bout de ce temps on ajoute un volume égal du réactif 2 décrit précédemment et on laisse réagir pendant 10 minutes toujours au bain d'huile à 105°. On refroidit ensuite sous un filet d'eau courante et on lit les extinctions.

La Fig. 1 donne les résultats obtenus pour l'adénosine et la cytidine. La méthode donne des résultats tout à fait reproductibles dans les limites des concentrations étudiées.

Nous avons vérifié la méthode en dosant des mélanges connus d'adénosine et de cytidine. Nos résultats se trouvent dans le Tableau II, dans lequel les concentrations sont données en γ pour 6 cm³.

TABLEAU II
EXTINCTION DE MÉLANGES D'ADÉNOSINE ET DE CYTIDINE

Concentration en γ par 6 cm ³		Extinction lue	Extinction calculée
Adénosine	Cytidine		
150	150	0,365	0,375
100	100	0,277	0,281
75	75	0,240	0,257
50	50	0,175	0,185

Méthode de dosage des nucléosides pyrimidiques en présence des nucléosides puriques.

Sur une partie de la solution à étudier on dose les nucléosides puriques par la méthode de BARRENSCHEEN et PEHAM. On trouve une valeur a qui correspond à une extinction b pour la méthode que nous venons de décrire au bain d'huile après traitement par le brome, c.à.d. que l'on transpose la valeur a sur la Fig. 1.

Sur une autre partie de la solution on détermine l'extinction au bain d'huile et après traitement par le brome : on trouve ainsi l'extinction pour les nucléosides pyrimidiques + les nucléosides puriques. Mettons que cette valeur soit c . On aura l'extinction et par conséquent la concentration des nucléosides pyrimidiques en soustrayant b de c .

Nous pensons que cette méthode pourra être appliquée avec succès à la recherche et au dosage quantitatif de nucléosides et même de nucléotides pyrimidiques libres, éventuellement présents dans les extraits d'organes.

RÉSUMÉ

Description d'une méthode permettant de doser les nucléosides pyrimidiques au moyen de la réaction de BIAL, modifiée d'après BARRENSCHEEN et PEHAM, la méthode permettant également de déterminer les nucléosides pyrimidiques en présence des nucléosides puriques.

SUMMARY

Description of a method of the estimation of pyrimidine nucleosides by means of the reaction of BIAL, modified according to BARRENSCHEEN and PEHAM. The method described also allows the determination of pyrimidine nucleosides in the presence of purine nucleosides.

ZUSAMMENFASSUNG

Beschreibung einer Methode zur Dosierung der Pyrimidin-Nukleosiden mit Hilfe der von BARRENSCHEEN und PEHAM modifizierten BIAL'schen Methode. Dieselbe Methode ermöglicht ebenfalls die Bestimmung der Pyrimidin-Nukleosiden in Gegenwart der Purin-Nukleosiden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. EMBDEN et E. LEHNARTZ, *Z. physiol. Chem.*, **201** (1931) 149.
- ² D. FERDMANN et O. FEINSCHMIDT, *Biochem. Z.*, **277** (1935) 203.
- ³ Z. DISCHE et K. SCHWARZ, *Mikrochim. Acta*, **2** (1937) 13.
- ⁴ W. MEJBAUM, *Z. physiol. Chem.*, **258** (1939) 117.
- ⁵ H. BARRENSCHEEN et A. PEHAM, *Z. physiol. Chem.*, **272** (1942) 81.
- ⁶ P. LEVENE et L. BASS, *Nucleic acids*, New York, 1931, p. 145.

Reçu le 26 Mars 1946.