

## REFERENCES

- <sup>1</sup> R. E. DAVIES, H. L. KORNBERG, AND G. M. WILSON, *Biochem. J.*, 52 (1952) (in the press).
- <sup>2</sup> I. S. EDELMAN, A. H. JAMES, AND F. D. MOORE, *Fed. Proc.*, 11 (1952) 40.
- <sup>3</sup> G. B. FORBES AND A. PERLEY, *J. Clin. Invest.*, 30 (1951) 558.
- <sup>4</sup> L. A. HAHN, G. C. HEVESY, AND O. H. REBBE, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1549.
- <sup>5</sup> J. F. MANERY AND W. F. BALE, *Am. J. Physiol.*, 132 (1941) 215.
- <sup>6</sup> H. MILLER AND G. M. WILSON, *Clinical Science* (in the press).
- <sup>7</sup> T. N. STERN, V. V. COLE, A. C. BASS, AND R. R. OVERMAN, *Am. J. Physiol.*, 164 (1951) 437.

Received October 27th, 1952

## RÉACTIONS COLORÉES SPÉCIFIQUES DE L'ARGININE ET DE LA TYROSINE RÉALISÉES APRÈS CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

par

ROGER ACHER ET CHARITY CROCKER

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

Les réactions colorées spécifiques de certains acides aminés, lorsqu'elles sont aussi fournies par leurs peptides, sont très précieuses pour la détection de ces derniers, et pour leur purification par chromatographie sur papier à partir d'hydrolysats partiels de protéines; il est cependant nécessaire que les colorations soient relativement stables et suffisamment sensibles pour être décelées sur des quantités de produits de l'ordre du  $\mu\text{g}$ . Quoique plusieurs modifications de techniques fondamentales connues aient déjà été proposées, nous croyons intéressant de décrire deux procédés qui, précisément au point de vue de la sensibilité et de la stabilité des colorations, nous ont été particulièrement utiles dans la recherche des peptides de l'arginine et de la tyrosine<sup>1,2</sup>.

**Arginine.** La réaction de SAKAGUCHI est faite sur le papier de la façon suivante: on dispose de deux solutions de stockage, l'une constituée par l' $\alpha$ -naphтол à 0.01% dans l'alcool contenant 5% d'urée, l'autre par de l'hypobromite de soude à 5% (0.7 ml de Br dans 100 ml de NaOH 5%). Avant emploi, on dissout environ 5% de potasse (5 pastilles pour 10 ml) dans la solution d' $\alpha$ -naphтол, et on pulvérise. L'arginine et ses peptides apparaissent en rouge sur fond blanc, et la coloration est stable plusieurs jours. Les autres acides aminés ne réagissent pas. Après chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le butanol-acide formique, on peut distinguer 0.2  $\mu\text{g}$  d'arginine. La réaction est réalisable sans soins particuliers lorsque le solvant utilisé est le butanol, le phénol ou la collidine. Elle peut être effectuée après la réaction à la ninhydrine ou à l'isatine<sup>3</sup>; dans ce cas, les colorations données par les autres acides aminés avec ces réactifs s'effacent et l'arginine apparaît en rouge. Toutefois la sensibilité est alors un peu moins grande.

Cette réaction s'effectue aussi avec tous les dérivés de l'arginine ayant le groupement guanidyle libre: en particulier elle a été précieuse pour l'identification de la 2,4-dinitrophénylarginine provenant de la copulation d'arginyl-peptides avec le réactif de SANGER<sup>1</sup>; après chromatographie sur papier et révélation, la teinte passe du jaune au rouge. Elle a également permis de détecter sur papier des peptides contenant de l'arginine et ne réagissant pratiquement pas à la ninhydrine<sup>2</sup> (prolyl-arginine).

**Tyrosine.** GERNGROSS, VOSS ET HERFELD<sup>4</sup> ont signalé que les phénols *para*-alkylés donnent avec l' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphтол une coloration rouge très sensible à condition que les positions en ortho de la fonction phénol ne soient pas substituées, ou seulement l'une d'entre elles par un groupement méthyle. Récemment, un dosage colorimétrique de la tyrosine à l'aide de ce réactif a été proposé<sup>5</sup>.

La réaction est faite sur le papier de la façon suivante: On pulvérise d'abord une solution d' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphтол à 0.1% dans l'alcool à 95°. Après séchage à air chaud, on effectue une seconde pulvérisation avec une solution aqueuse d'acide nitrique à 10%. La feuille est alors placée 3 minutes au four à 100°; la tyrosine et ses dérivés apparaissent en rouge sur fond vert pâle; la coloration subsiste une demi-heure environ, puis vire à l'orange et s'affaiblit peu à peu. 1 à 2  $\mu\text{g}$  sont décelables

après chromatographie. La réaction est facilement réalisable si le solvant utilisé est le butanol, mais dans le cas du phénol ou de la collidine, une élimination très poussée du solvant est nécessaire. Si la révélation a été faite avec la ninhydrine, on peut appliquer ensuite la réaction spécifique de la tyrosine, qui passe du violet au rouge, alors que les autres taches disparaissent; la réaction dans ce cas est moins sensible.

Des essais effectués avec tous les autres acides aminés habituellement présents dans les protéines, nous ont permis de constater que la réaction n'est donnée que par la tyrosine et certains de ces dérivés (Tableau I).

L'examen du Tableau I montre: 1. la nécessité de la substitution en *para* (pas de réaction avec la métyrosine); 2. la nécessité d'une fonction en *ortho* libre dans le cas de la substitution par un halogène, d'où distinction commode entre la mono- et la di-iodotyrosine. La substitution par un groupement nitro ou hydroxy inhibe la réaction; 3. Le caractère général de la réaction vis à vis des peptides de la tyrosine, quelle que soit la position de celle-ci dans le peptide.

TABLEAU I

Substance	$R_F^*$	Ninhydrine	$\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol
<i>p</i> -Tyrosine	0.30	+	+
<i>m</i> -Tyrosine	0.30	+	—
3-Iodotyrosine	0.45	+	+
3-Bromotyrosine	0.41	+	+
3-Nitrotyrosine	0.32	+	—
3,5-Diiodotyrosine	0.55	+	—
3,5-Dibromotyrosine	0.50	+	—
Thyronine	0.62	+	+
3,5-Diiodothyronine	0.71	+	+
3,5-Dibromothyronine	0.66	+	+
Thyroxine	0.78	+	—
Adrénaline	—	—	—
Glycyl-tyrosine	0.25	+	+
Tyrosyl-glycine	0.25	+	+
Glycyl-tyrosyl-glycine	0.11	+	+
Cystéyl-tyrosine	0.27	+	+
(trainée)			

\* Le  $R_F$  est le rapport de la distance parcourue par la substance à celle parcourue par le solvant.

Les  $R_F$  ont été mesurés sur papier Whatman n° 1 dans le butanol-acide formique (*n*-butanol 75, acide formique 15, eau 10).

A très fortes concentrations, la diiodotyrosine, la dibromotyrosine, la thyroxine et l'adrénaline, donnent avec l' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol une coloration jaune.

Nous sommes heureux de remercier ici Dr R. MICHEL, Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, au Collège de France, qui a bien voulu nous procurer plusieurs dérivés et peptides de la tyrosine.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> R. ACHER, J. THAUREAUX, C. CROCKER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 339.
- <sup>2</sup> R. ACHER, J. CHAUVET ET P. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952).
- <sup>3</sup> R. ACHER, C. FROMAGEOT ET M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- <sup>4</sup> O. GERNGROSS, K. VOSS ET H. HERFELD, *Ber.*, 66 (1933) 435.
- <sup>5</sup> S. UDENFRIEND ET J. R. COOPER, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 227.

Reçu le 10 octobre 1952