

4,4'-Diacetoxy- $\alpha$ -äthyl- $\beta$ -(2-diäthylamino-äthyl)-stilben. Aus 14 g 4,4'-Dimethoxy- $\alpha$ -äthyl- $\beta$ -(2-diäthylamino-äthyl)-stilben werden nach obiger Methode 8 g (= 48,5%) 4,4'-Diacetoxy- $\alpha$ -äthyl- $\beta$ -(2-diäthylamino-äthyl)-stilben vom Sdp.<sub>0,1</sub> 204–205° erhalten

$C_{26}H_{33}O_4N$	Ber. C 73,71	H 7,86	N 3,31%
	Gef. „ 73,95	„ 8,01	„ 3,29%

Die Analysen wurden in unserem Mikroanalytischen Laboratorium (Leitung Frl. Dr. M. Schaerer) ausgeführt.

### Zusammenfassung.

1. Es wird die Synthese von Derivaten des 1,2-Diaminocyclohexans und deren Antihistaminwirksamkeit beschrieben.

2. Als Nachtrag zu unserer III. Mitteilung wird die Synthese von  $\alpha$ -Äthyl- $\beta$ -dialkylaminoäthyl-4,4'-diacetoxy-stilbenen beschrieben.

Pharmazeutisch-wissenschaftliche Laboratorien  
(Leitung: Dr. W. Hentrich) der J. R. Geigy A.G., Basel.

## 230. Etude et dosage de la tyrosine II

par Y. Rusconi, D. Monnier et P. E. Wenger.

(9 VIII 51)

La présente recherche entre dans le cadre d'une étude générale de l'albumine et de ses constituants<sup>1</sup>). Nous avons déjà établi une méthode de dosage polarographique de la tyrosine préalablement traitée par l'acide nitrique 4-n. Afin de rendre la méthode plus sélective, nous avons entrepris une étude systématique de la nitration de la tyrosine. Dans chaque cas, la liqueur obtenue après attaque à l'acide nitrique a été traitée par l'éther. La phase aqueuse et la phase étherée ont été polarographiées. Ces données nous ont permis d'établir les conditions les meilleures d'un dosage de la tyrosine. Nous avons également mis au point une méthode colorimétrique.

### 1. Etude de la nitration de la tyrosine.

a) *Essais qualitatifs.* Suivant les concentrations d'acide nitrique utilisées pour nitrer la tyrosine, les composés obtenus peuvent être très différents, ce qui pourra nous permettre d'établir des dosages sélectifs de la tyrosine. Cette nitration sélective peut encore d'ailleurs être complétée par des extractions à l'éther, nous conduisant à des séparations intéressantes.

Nous avons effectué un certain nombre de nitrations à l'aide d'acide nitrique à diverses concentrations, de 0,1-n. à 14,8-n. Les liqueurs obtenues ont été traitées par l'éther et les deux phases, éther-eau, ont été examinées au polarographe.

<sup>1</sup>) D. Monnier & Y. Rusconi, Helv. **34**, 1297 (1951).

Les essais qualitatifs effectués nous ont donné les réactions suivantes:

Essais	Tyrosine g	HNO <sub>3</sub>	Phases		Résidus après évaporation	
			éther	eau	de l'éther	de l'eau
1	0,1	14,8-n.	très jaune	incolore	jaune, liquide	blanc, sec
2	0,1	7,4-n.	très jaune	incolore	jaune, liquide	blanc, sec
3	0,1	2-n.	jaune	faiblement jaune	jaune, liquide	blanc-jaune, sec
4	0,1	n.	faiblement jaune	jaune	jaune, liquide	brun, sirupeux
5	0,1	0,4-n.	très faible- ment jaune	très jaune	jaune, sec	brun, sirupeux
6	0,1	0,1-n.	incolore	incolore	—	brun, sirupeux

On voit donc que la nitration de la tyrosine peut donner lieu à la formation de différents composés.

Pour les concentrations les plus fortes d'acide nitrique, la scission de la molécule de tyrosine, déjà citée, semble bien se confirmer; il y aurait donc d'une part scission de la chaîne latérale avec formation d'acide oxalique (phase aqueuse) et d'autre part nitration du noyau aromatique restant (phase étherée). Pour les concentrations les plus faibles d'acide nitrique, les réactions sont très différentes et moins bien définies, pour le moment. L'étude des corps obtenus dans ces conditions fera l'objet d'un prochain travail.

b) *Essais quantitatifs*. Il nous a paru intéressant d'examiner polarographiquement les corps obtenus par diverses nitrations.

*Réactifs utilisés:*

1. Acide nitrique *Merck* à 65% ( $D = 1,4$ );
2. Tyrosine *Merck*;
3. Hydroxyde de potassium puriss.;
4. Ether *Merck*;
5. Solution tampon pH 5: 10,3 cm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2-m. + 9,7 cm<sup>3</sup> acide citrique 0,1-m.

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée.

*Appareillage:* Les essais polarographiques ont été effectués avec l'appareil *Sargent* modèle XXI.

Temps de gouttes 4,32 secondes.

*Mode opératoire:* Six prises de 0,1 g de tyrosine, introduites dans des béchers de 50 cm<sup>3</sup>, sont traitées parallèlement par 20 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique à 6 concentrations différentes: 14,8-n., 7,4-n., 2-n., n., 0,4-n. et 0,1-n. Chaque bécher est recouvert d'un verre de montre et porté au bain-marie pendant 120 min. Nous diluons avec un égal volume d'eau bidistillée et nous laissons refroidir. Nous effectuons ensuite les extractions à l'éther; par prise, il faut environ 5 portions de 15 cm<sup>3</sup> d'éther pour une séparation quantitative.

Examinons pour commencer la phase étherée: l'éther est évaporé à sec, à l'air, à la température ordinaire. Les résidus obtenus sont repris par un peu d'eau bidistillée (environ 20 cm<sup>3</sup>) et neutralisés (papier de tournesol) par une solution concentrée d'hydroxyde de potassium. Lorsque cette solution est à peu près neutre, nous l'introduisons dans un ballon jaugé de 100 cm<sup>3</sup> et nous complétons au trait de jauge avec l'eau bidistillée. Nous introduisons alors 4 cm<sup>3</sup> de cette liqueur dans un ballon jaugé de 20 cm<sup>3</sup>, nous ajoutons 4 cm<sup>3</sup> de solution tampon (pH 5) et nous complétons à 20 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée. La solution est alors prête à être polarographiée.

Nous avons obtenu alors les résultats suivants:

Essais	Tyrosine g/l	HNO <sub>3</sub>	E ½* volt	saut μ A
1	0,2	14,8-n.	0,61	19,1
2	0,2	7,4-n.	0,60	9,4
3	0,2	2-n.	0,68	9,3
4	0,2	n.	0,66	20,2
5	0,2	0,4-n.	0,83	19,8
6	0,2	0,1-n.	—	—

\* Potentiels non rapportés à une électrode de référence.

Nous avons examiné ensuite de la même façon la phase aqueuse résultant de l'extraction à l'éther. Cette liqueur est évaporée à sec au b.-m., on reprend le résidu, brun sirupeux, par 100 cm<sup>3</sup> d'eau. Nous prélevons 10 cm<sup>3</sup> de cette liqueur, que nous introduisons dans un ballon jaugé de 20 cm<sup>3</sup>. Nous ajoutons 4 cm<sup>3</sup> de solution tampon et nous complétons à 20 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée. La solution est alors prête à être polarographiée. Nous avons obtenu les résultats suivants:

Essais	Tyrosine g/l	HNO <sub>3</sub>	E ½ (v) saut 1	i (μA) saut 1	E ½ (v) saut 2	i (μA) saut 2
1	0,5	14,8-n.	0,38	0,72	1,14	3,44
2	0,5	7,4-n.	0,38	0,48	1,14	3,76
3	0,5	2-n.	0,40	0,80	1,16	4,10
4	0,5	n.	0,45	0,80	1,14	3,04
5	0,5	0,4-n.	0,58	3,50	1,30	1,92
6	0,5	0,1-n.	0,69	27,40	—	—

Nous remarquons que nous avons deux réductions; le deuxième saut correspond bien à la réduction de l'acide oxalique.

## 2. Dosage polarographique de la tyrosine.

Dans un article précédent<sup>1)</sup>, nous avons déjà donné une méthode de dosage polarographique de la tyrosine, par nitration à l'aide d'acide nitrique 4-n. et polarographie de la solution éthérée.

Après notre étude sur la nitration, il nous a paru plus avantageux de nitrer avec l'acide le plus dilué possible. Nous avons choisi l'acide 0,6-n. pour la nitration et nous avons établi une courbe d'étalonnage pour la tyrosine nitrée dans ces conditions et extraite dans l'éther.

Les polarogrammes ont été exécutés au pH 5,2.

### Etablissement de la courbe d'étalonnage.

Essais . . .	1	2	3	4	5	6	7	8
Tyrosine g/l .	0,025	0,05	0,0625	0,075	0,125	0,187	0,3125	0,6
Sauts μA . .	3,1	5,3	6,7	8,1	13,2	19,2	31,4	54,9

<sup>1)</sup> Loc. cit.

En ce qui concerne les résidus aqueux, non solubles dans l'éther, nous avons examiné ceux obtenus par nitration à l'acide nitrique 0,6-n. Les résultats polarographiques obtenus sont irréguliers et ne nous permettent pas d'établir une courbe d'étalonnage:

Essais . . . . .	1	2	3
Tyrosine g/l . . .	0,5625	0,6250	1,1250
Saut 1 $\mu$ A . . .	2,8	3,4	5,0
Saut 2 $\mu$ A . . .	1,36	2,33	3,60

Quant à la nitration à l'acide 0,1-n., elle nous donne les résultats suivants, pour les résidus aqueux:

Essais . . . . .	1	2	3
Tyrosine g/l . . .	0,125	0,250	0,375
Saut $\mu$ A . . . .	10,3	22,5	29,0

Ce mode de nitration peut être intéressant, il fera l'objet d'un prochain travail.

Dans ce cas particulier ( $\text{HNO}_3$  0,1-n.), l'extraction à l'éther n'est pas nécessaire. En effet, si nous traitons une solution de tyrosine par l'acide nitrique 0,1-n. et si nous effectuons une extraction à l'éther, aucun composé réductible, dans nos conditions expérimentales, ne passe dans l'éther.

Nous avons donc adopté le mode opératoire suivant:

1. Attaque de la tyrosine par 20 cm<sup>3</sup> d' $\text{HNO}_3$  0,1-n. au bain-marie.
2. Evaporation jusqu'à l'obtention d'un résidu brun sirupeux. Le résidu obtenu est alors repris par l'eau, additionné de la solution tampon et polarographié.

### 3. Essais colorimétriques.

Il nous a paru intéressant d'envisager la possibilité de mettre au point une méthode de dosage colorimétrique de la tyrosine, après nitration. En effet, les solutions préparées pour nos essais polarographiques sont d'un jaune intense, ce qui pourrait servir éventuellement à un dosage très sensible.

Nous avons d'abord établi rapidement une courbe de l'intensité de coloration de notre «nitrotyrosine» en fonction de la concentration d'acide nitrique utilisé pour la nitration (de 0,6-n. à 14,8-n.). Nous avons au préalable fait l'extraction à l'éther et les essais ont été effectués sur la liqueur étherée. D'après les résultats obtenus, c'est la tyrosine nitrée avec l'acide 0,6-n. qui donne l'intensité de coloration maximum.

Pour nos déterminations colorimétriques, nous avons utilisé un spectrophotomètre *Spekker Hilger*.

Toutes les mesures ont été faites à l'aide d'un filtre bleu-violet et au moyen de la cuve de 1 cm.

*Mode opératoire.* La nitration de la tyrosine ( $\text{HNO}_3$  0,6-n.) et l'extraction par l'éther s'effectuent de façon identique aux opérations de nos essais polarographiques.

La liqueur étherée renfermant la nitrotyrosine est évaporée à sec, à l'air, à la température ordinaire. Le résidu jaune cristallin est repris par 10 cm<sup>3</sup> d'alcool absolu et dilué ensuite à 100 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée.

Nous prélevons n cm<sup>3</sup> de cette solution que nous introduisons dans un ballon jaugé de 20 cm<sup>3</sup>. Nous ajoutons à cette liqueur 4 cm<sup>3</sup> de solution tampon pH 5,2 et nous complétons le volume avec de l'eau (le pH de 5,2 a été choisi pour nos essais polarographiques;

il est probable qu'un pH plus élevé nous donnerait des résultats colorimétriques encore plus sensibles). La solution est prête à être colorimétrée.

Par ce procédé, nous avons obtenu les résultats suivants:

Essais . . . . .	1	2	3	4
Tyrosine g/l . . .	0,025	0,05	0,0625	0,075
Log $I_0/I$ . . . .	0,455	0,89	1,18	1,37

Comme nous pouvons le voir en comparant nos résultats obtenus au polarographe, et au colorimètre, les deux méthodes sont très sensibles.

*Précision, sensibilité et spécificité.* La méthode polarographique proposée permet de doser la tyrosine à des concentrations comprises entre 0,025 et 0,3 g/l avec une précision de  $\pm 0,0005$  pour une sensibilité de l'appareil de 0,1  $\mu\text{A}/\text{mm}$ . En augmentant cette dernière on peut encore doser 0,005 g/l de tyrosine (50  $\gamma/10\text{ cm}^3$ ). La méthode colorimétrique est un peu plus sensible peut-être, mais elle est moins spécifique. Elle est en outre gênée par les troubles les plus ténus, fréquents dans les dosages biologiques, qui causent parfois de graves erreurs sans que l'analyste s'en aperçoive.

Comme il a été dit, la méthode polarographique présente une bonne spécificité, car les conditions de nitration sont très modérées et le saut se produit à un  $E_{\frac{1}{2}}$  au début du polarogramme. Nous n'avons pas encore fait de recherche systématique des substances gênantes. Nous savons pourtant que la tyrosine ne peut être dosée en présence de tryptophane. En effet, ce composé se nitre aussi et donne un saut au polarographe non loin de celui de la tyrosine nitrée. Il y a donc interférence. Peut-être que, par une nitration encore moins énergique, il sera possible de trouver une solution à ce problème. Des travaux sont en cours.

#### RÉSUMÉ.

Nous avons effectué une étude de la nitration de la tyrosine au polarographe sur la phase aqueuse et sur la partie soluble dans l'éther. Des résultats obtenus, nous avons établi une méthode polarographique et colorimétrique de dosage de la tyrosine, pour des concentrations comprises entre 0,005 et 0,3 g/l. La précision est de 3 à 5%. La méthode polarographique présente une bonne spécificité; toutefois, elle est gênée par le tryptophane.

Laboratoire de Chimie analytique et de Microchimie  
de l'Université de Genève.