

Mit 3 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O verdünnt und 7mal mit je 20 cm<sup>3</sup> Chloroform ausgeschüttelt, wobei jeder Auszug 5 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O passierte. Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen gab 50,4 mg weissen Schaum, der aus Aceton-Äther 40 mg reines Ausgangsmaterial vom Smp. 272° lieferte.

Die Mikroanalysen wurden teilweise im Mikrolabor. der Organ.-chem. Anstalt, Basel (Leitung *E. Thommen*) (OAB), teilweise bei Frau Dr. *M. Sobotka* und Herrn Dr. *E. Wiesenberger*, Graz (*S. W.*) ausgeführt. Die Ultraviolet-Absorptionsspektren wurden von Herrn *P. Zoller* mit einem *Beckman*-Quarz-Spektralphotometer Modell DU in alkoholischer Lösung aufgenommen.

### Zusammenfassung.

Extraktion der Wurzeln und Stengel von *Strophanthus gracilis* *K. Sch.* et *Pax* gab in etwa 0,7% Ausbeute ein rohes Glykosidgemisch, das nach Hydrolyse mit Strophanthobiase zu etwa 1/5 äther- und chloroformlösliche Produkte lieferte. Aus diesen liessen sich, teilweise nach Acetylierung, 9 kristallisierte Stoffe in kleinen Mengen isolieren. Drei davon konnten als Strophanthidin, Strophanthidol und Emicymarin identifiziert werden. Letzteres wurde in grösster Menge erhalten. Die anderen 6 Kristallisate, deren Einheitlichkeit nicht durchwegs sicher ist, stellen digitaloide Glykoside, oder AcetylDerivate von solchen dar. Sie wurden vorläufig als Substanz AA 53, Substanz AA 56, Substanz AA 57, Substanz AA 55, Kristallisat AA 59 und Acetat AA 64 bezeichnet.

Pharmazeutische Anstalt und Organisch-chemische Anstalt  
der Universität Basel.

## 157. Etude polarographique des dérivés nitrés de l'albumine, de la tyrosine et de la phénylalanine

par **D. Monnier et Y. Rusconi.**

(17 V 51)

### A. Albumine.

L'étude polarographique des albumines ne présente, dans l'état actuel des recherches, que peu d'intérêt par le fait que la réduction si elle a lieu, se produit soit au voisinage de celle des ions alcalins, soit à un potentiel plus négatif encore. Or, toutes les albumines renferment, si elles n'ont pas été spécialement purifiées, des quantités appréciables de sodium et de potassium. Il est, par contre, facile de nitrer l'albumine. Cette réaction, effectuée dans des conditions bien déterminées, donne naissance à des composés aisément réductibles au polarographe. Les vagues obtenues sont bien dessinées, parfaitement reproductibles, et la hauteur des sauts est proportionnelle à la concentration en albumine. Lors de la réduction des dérivés nitrés organiques, l'ion hydrogène participe à la réaction, c'est pourquoi tous nos essais ont été effectués en milieux tamponnés.

L'appareil utilisé est un *Sargent*, modèle XXI.

Des études systématiques ont été entreprises. Nous avons fait varier successivement le pH, le temps de nitration, la concentration d'albumine et les conditions de nitration. La substance utilisée est une albumine de sang *Schering-Kahlbaum*.

### 1. Polarographie de l'albumine nitrée, à divers pH.

La concentration de l'albumine et les conditions de nitration ont été maintenues constantes.

*Conditions de nitration.* Après divers essais, nous nous sommes arrêtés au mode opératoire qui suit :

A 0,5 g d'albumine, on ajoute un mélange de 8 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique et 5 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique concentrés. On porte le tout au b. m. pendant 90 min. (ce temps a été porté à 180 min. au cours des essais ultérieurs), puis on laisse refroidir. On ajoute 30 cm<sup>3</sup> d'eau bidistillée, on refroidit à nouveau et on effectue une extraction à l'éther 4 à 5 fois, jusqu'à ce que ce dernier ne se colore plus en jaune. Cette opération nécessite un volume total d'éther de 75 cm<sup>3</sup> environ. On évapore l'éther et on reprend le résidu par 10 cm<sup>3</sup> d'alcool éthylique pur, puis on ajoute encore 10 à 20 cm<sup>3</sup> d'eau et on neutralise par de la potasse concentrée (tournesol). Le volume est complété à 50 cm<sup>3</sup> par addition d'eau bidistillée. 4 cm<sup>3</sup> de cette solution sont introduits dans un ballon jaugé de 20 cm<sup>3</sup>, auxquels on ajoute 4 cm<sup>3</sup> de tampon, et on complète au trait de jauge. La liqueur obtenue est polarographiée après passage pendant 10 min. d'un courant d'hydrogène ou d'azote (pour chasser l'oxygène). La concentration de l'albumine est de 2 g/l. Les valeurs obtenues sont portées dans le tableau I.

Tableau I.

pH	Solutions tampons utilisées cm <sup>3</sup> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> H 0,2-m.	cm <sup>3</sup> ac. citrique 0,1-m.	E <sub>½</sub> volt	μa
2,2	0,4	19,6	0,55	12,2
3,2	4,94	15,06	0,57	13,0
4	7,71	12,29	0,64	12,2
5	10,3	9,7	0,67	12,3
6	12,63	7,37	0,70	12,8
7	16,47	3,53	0,69	11,1
7,4	18,17	1,83	0,66	7,3
8	19,45	0,55	0,67	7,0

Toutes les valeurs de E<sub>½</sub> données dans ce travail, sont rapportées à la surface mercure-solution.

On constate que pour les pH peu élevés, le courant de diffusion est constant. Les variations observées proviennent sans doute du fait que la nitration, dans les conditions où nous avons travaillé, n'est pas terminée (v. tableau ci-dessus). A partir du pH 6, on observe une brusque diminution du courant de diffusion. Ce dernier se stabilise à un pH compris entre 7 et 8.

Des constatations identiques ont été faites par *Pearson*<sup>1)</sup> avec les dérivés nitrés du benzène et du toluène. Ce phénomène montre que la réduction polarographique des dérivés nitrés organiques est différente selon qu'on opère en milieu acide ou basique. Dans le premier cas, la réduction conduit à la formation de dérivés hydroxylaminés, dans le second cas, on obtient probablement des composés polyaminés.

Dans les conditions de notre travail, les polarogrammes ne présentent pas de maximum.

<sup>1)</sup> Soc. 44, 683 (1947).

*2. Etude polarographique de l'albumine nitrée en fonction du temps de nitration.*

Avant d'établir une courbe d'étalonnage de l'albumine nitrée, il est nécessaire de connaître le temps après lequel la nitration peut être considérée comme terminée, dans les conditions indiquées à la p. 1298. Nous effectuons donc les polarogrammes après divers temps de nitration, en procédant comme il a été indiqué plus haut.

La concentration constante de l'albumine est de 2 g/l. Nous avons fait des essais au pH 5. Les valeurs obtenues figurent au tableau II.

**Tableau II.**

Temps en min... .	40	45	75	90	135	150	600
Crt. diff. en $\mu\text{a}$ . .	20	18,5	14,9	13,8	12,8	12,5	12,4

Après 150 min., la nitration est pratiquement terminée et le courant de diffusion est constant et reproductible. Les valeurs données dans ce tableau montrent que dans les premières minutes, le courant de diffusion croît rapidement avec le temps de nitration puis, après un certain temps, ce courant diminue et tend vers une valeur constante. Tout se passe comme si un des dérivés formés était détruit par suite d'une nitration trop énergique. On sait, en effet, que la tyrosine, par exemple, donne, après une nitration trop énergique, un courant de diffusion beaucoup trop petit, ne correspondant pas du tout à la concentration.

Pour toutes les nitrations ultérieures, nous fixons le temps de nitration à 180 min.

*3. Etude polarographique de l'albumine, nitrée en fonction de la concentration en albumine (courbe d'étalonnage).*

Les essais ont été effectués, les uns au pH 5, les autres au pH 6, dans les conditions indiquées plus haut (v. p. 1298); temps de nitration 180 min. Les résultats sont portés dans le tableau III et sur la figure 1, courbe III.

**Tableau III.**

Albumine g/l	pH 5 $\mu\text{a}$	$K = \frac{id}{c \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}}$	pH 6 $\mu\text{a}$	$K = \frac{id}{c \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}}$
0,16	—	—	1,9	0,65
0,50	—	—	3,2	0,35
0,80	6,1	0,4	—	—
1,00	6,5	0,35	6,3	—
1,20	8,4	0,38	—	—
1,50	—	—	10,2	0,37
1,60	9,9	0,33	10,4	0,31
2,00	12,5	0,34	—	—
2,40	14,6	0,33	13,8	0,31
2,50	—	—	14,8	0,32
3,60	—	—	20,2	0,30
7,20	—	—	34,0	0,26
8,00	33,2	0,22	—	—

*Remarques.* Les courbes obtenues au pH 5 et au pH 6 sont identiques, ainsi que le laissaient prévoir les valeurs données à la page 1298, dans le tableau I. Pour des concentrations en albumine ne dépassant pas 5 g/l, le courant de diffusion est proportionnel à la quantité d'albumine nitrée. Un dosage de l'albumine par ce procédé donne une erreur de 2 à 5% environ pour des concentrations allant jusqu'à 5 g/l.

K est la constante du courant de diffusion, dans laquelle c est exprimé en g/l.

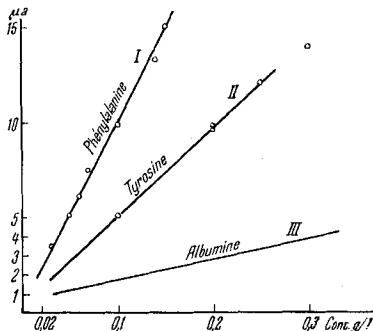


Fig. 1.

#### 4. Détermination de n et étude de la courbe polarographique.

a) *Par la formule d'Ilkovic:*  $n = id/605 \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot C$ , dans laquelle id est le courant de diffusion limite (en  $\mu$ a); D, le coefficient de diffusion en  $\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ ; m, la masse de mercure qui s'écoule du capillaire en  $\text{mg} \cdot \text{sec}^{-1}$ ; t, le temps de goutte en seconde; n, le nombre d'électrons participant à la réduction; C, la concentration exprimée en mol./litre.

Nous avons calculé n sur la courbe 2, dont les caractéristiques sont données à la p. 1301.

m et t ont été déterminés au potentiel  $E_{1/2}$  de la courbe. Le coefficient de diffusion n'est pas connu et nous devons faire une hypothèse, toute gratuite du reste, celle de supposer que l'albumine est suffisamment décomposée pour que l'on puisse prendre le coefficient de diffusion de l'acide picrique ( $D = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ ).

Enfin, il n'est pas possible d'exprimer la concentration en mol./l car nous ignorons tout du poids moléculaire de la substance après la nitration. Nous l'exprimerons donc en g/l.

$$\begin{aligned} m &= 1,73 \text{ mg} \cdot \text{sec}^{-1} & t &= 4,32 \text{ sec.} \\ id &= 12,3 \mu\text{a} & D &= 7,7 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1} \end{aligned}$$

Dans ces conditions  $n \cdot D^{1/2} = 0,0055$ , et  $n = 1,98$ .

Cette valeur n'a, bien entendu, aucune signification en elle-même, mais elle pourra pourtant être utilisée lors de l'étude polarographique systématique des dérivés nitrés des diverses protéines.

b) Par l'expression  $E = f(i)$ . La valeur de n peut être déterminée au moyen de l'expression:

$$E = E_{\frac{1}{2}} - \frac{0,059}{n} \log \frac{i}{id - i},$$

dans laquelle id est le courant limite de diffusion; i, le courant de diffusion au potentiel  $E$ .

Pour que la valeur trouvée au potentiel corresponde au nombre d'électrons qui participent à la réaction sur l'électrode, il faut que celle-ci soit réversible. Pourtant, si en divers points de la courbe polarographique, on trouve une même valeur de n, on peut supposer que l'on est en présence d'une réaction de réduction simple. Cette valeur peut être aussi caractéristique pour un type déterminé de protéine. Nous avons calculé n pour quelques courbes caractéristiques obtenues au cours de nos essais.

*Courbe 1.* Concentration en albumine 2 g/l.

pH = 5  $E_{\frac{1}{2}} = 0,61$  v  $id = 18,7 \mu A$

Temps de nitration: 45 min.

L'oxygène n'a pas été éliminé.

**Tableau IV.**

E	0,4	0,49	0,60	0,68	0,80
i	0,55	3,4	8,6	13,2	18,0
n	0,43	0,35	0,41	0,32	0,43

*Courbe 2.*

Concentration en albumine 2 g/l.

Temps de nitration 515 min.

pH = 5  $E_{\frac{1}{2}} = 0,64$  v  $id = 12,3 \mu A$

**Tableau V.**

E	0,4	0,46	0,52	0,58	0,60	0,71	0,77
i	0,3	0,9	1,75	3,7	4,4	6,7	10,6
n	0,39	0,36	0,35	0,36	0,38	0,32	0,36

*Courbe 3.* Cette courbe est une de celles qui ont servi à établir la droite d'étalonnage. Elle est prise dans les conditions correspondant aux résultats les meilleurs. En lieu et place du tableau nous donnons la droite correspondante, en portant sur les ordonnées  $\log(i/id - i)$  et sur les abscisses, les potentiels (fig. 2).

Concentration en albumine 2,4 g/l.

Temps de nitration 180 min.

pH = 5  $E_{\frac{1}{2}} = 0,68$  v  $id = 14,6 \mu A$

La réaction à la cathode n'est pas réversible, ainsi que le prouvent les valeurs trouvées pour n. Elles ne correspondent donc pas aux nombres d'électrons échangés. Il est néanmoins intéressant de constater que sur les diverses parties des courbes étudiées, n reste constant. Nous sommes donc probablement en présence d'une réaction simple.

Sur la figure 2 sont aussi portées les valeurs trouvées pour la tyrosine et la phénylalanine.

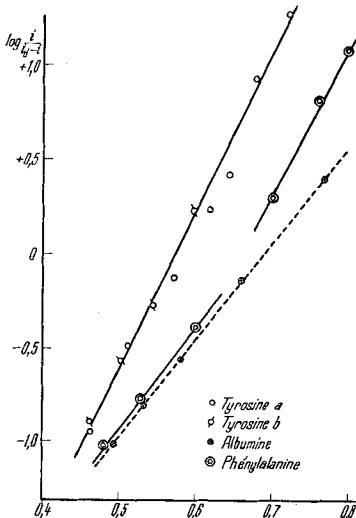


Fig. 2.

### 5. Etude d'albumines de diverses origines.

Nous avons effectué la nitration de deux autres albumines de sang, l'une rouge (technique), provenant de la maison *Merck*, et l'autre dite atomisée, ayant l'aspect d'une poudre blanche très fine. La nitration et les diverses opérations ont été conduites selon la méthode indiquée à la page 1298. Les valeurs obtenues sont très semblables à celles de l'albumine de la maison *Schering-Kahlbaum*. En particulier, la forme de la courbe est identique, les valeurs de  $i$  très semblables. On observe de légères variations sur les valeurs de  $i$  en fonction de la concentration. Elles proviennent sans doute de la différence de pureté des diverses albumines utilisées.

#### Albumine rouge.

$$id = 16,3 \mu\text{a} \quad \text{Conc.} = 2 \text{ g/l} \quad E_{\frac{1}{2}} = 0,66 \text{ v} \quad \text{pH 5}$$

E	0,4	0,45	0,51	0,60	0,72	0,76	0,81	0,86
i	0,5	1,15	2,35	5,35	10,9	12,55	14,4	15,3
n	0,340	0,308	0,304	0,280	0,300	0,310	0,348	0,335

#### Albumine atomisée.

$$id = 13,7 \mu\text{a} \quad \text{Conc.} = 2 \text{ g/l} \quad E_{\frac{1}{2}} = 0,66 \text{ v} \quad \text{pH 5}$$

E	0,42	0,46	0,52	0,72	0,76	0,82	0,86
i	0,7	1,15	2,3	9,3	10,9	12,65	13,3
n	0,312	0,308	0,294	0,319	0,347	0,400	0,450

Voir aussi fig. 2.

### *6. Considérations générales.*

Dans ce travail, seuls le ou les dérivés nitrés de l'albumine solubles dans l'éther ont été étudiés. Or, après extraction à l'éther, l'eau garde une coloration jaune. Elle renferme donc un composé, dérivé nitré probablement, que nous avons cherché à déceler au polarographe. Une étude directe de la solution aqueuse n'est pas possible car elle renferme de très grandes quantités de nitrate et de sulfate de potassium après neutralisation du mélange sulfo-nitrique avec la potasse. Comme le composé nitré étudié est très soluble dans l'eau, nous avons évaporé une partie de celle-ci. Une grande quantité des sels potassiques ont ainsi précipité. Ils ont été éliminés par centrifugation. Le polarogramme effectué sur cette solution fortement colorée en jaune ne donne que des sauts peu importants et non reproductibles.

Le fait que nous trouvons des courbes polarographiques très simples pour les solutions éthérrées, avec des valeurs de  $n$  constantes, semble prouver que la nitration de l'albumine dans les conditions de notre travail ne donne naissance qu'à un nombre très restreint de composés nitrés et que ceux-ci ne renferment qu'un ou deux groupes nitro. L'étude polarographique de l'albumine nitrée présente un réel intérêt. En effet, il doit être possible de doser par cette méthode un certain nombre de constituants de ces protéines, bien que la plupart des composés nitrés organiques donnent des sauts dont les valeurs de  $E^{1/2}$  sont souvent très rapprochées. Une nitration fractionnée, par exemple, doit augmenter la sélectivité de la méthode. Ainsi, on peut nitrer la tyrosine avec l'acide nitrique dilué alors que la phénylalanine ne subit aucune transformation dans ces conditions. Pour nitrer ce composé, il faut un mélange sulfo-nitrique. Il est aussi possible d'éliminer la tyrosine d'un mélange par une oxydation au permanganate en milieu sulfurique, conditions dans lesquelles la phénylalanine n'entre pas en réaction. Enfin, par le jeu des pH des solutions de base, par l'addition des réactifs appropriés, on pourra probablement établir une méthode sélective et rapide d'estimation de certains constituants de diverses protéines. Des travaux sont en cours à ce sujet. Pour faciliter ce travail, nous avons entrepris l'étude de deux constituants importants de l'albumine: la tyrosine et la phénylalanine.

### **B. Etude de la tyrosine.**

La tyrosine se nitre facilement en milieu acide nitrique dilué. Dans des conditions plus énergiques, en milieu sulfo-nitrique par exemple, on observe une destruction importante de la tyrosine, qui se traduit au polarogramme par une diminution de la hauteur des sauts et par le fait que les résultats ne sont plus reproductibles. Après une série d'essais, nous nous sommes arrêtés aux conditions suivantes, en ce qui concerne la nitration, qui correspondent à celles préconisées par *L. Genevois*<sup>1)</sup>:

<sup>1)</sup> Ann. Chim. Anal. 29, 103 (1947).

On fait réagir sur la tyrosine 20 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique 4-n. Le mélange est porté à 55° pendant 2 h. On effectue alors l'extraction à l'éther. Dès cet instant, on procède comme pour l'albumine et les polarogrammes sont établis dans les mêmes conditions. Toutes les mesures ont été faites au pH 5. Les résultats de la courbe d'étalonnage sont portés dans le tableau VI (voir aussi fig. 1, page 1300).

Tableau VI.

Concentration g/l	0,1	0,2	0,25	0,3
Conc. mol./l	$5,54 \cdot 10^{-4}$	$1,11 \cdot 10^{-3}$	$1,38 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$
id ( $\mu$ A)	5	9,7	12,3	14,1
$K = \frac{id}{c \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}}$	4,9	4,73	4,82	4,55

Il y a donc possibilité de doser la tyrosine par polarographie avec une précision de 2 à 5%.

*Calcul de n.* Les valeurs de n se calculent d'après les formules déjà citées pour l'albumine (p. 1300). Dans le cas de la tyrosine, il est possible d'obtenir des valeurs réelles de n car on peut exprimer la concentration en mol./l. Reste l'erreur que l'on fait sur le coefficient de diffusion qui n'est pas connu pour ce composé. Nous prendrons celui de l'acide picrique.

### 1. Par la formule d'Irkovic:

$$m = 1,73 \text{ mg} \cdot \text{sec.}^{-1}; t = 4,32 \text{ sec.}; D = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec.}^{-1}$$

Pour les divers polarogrammes ayant servi à l'établissement de la courbe d'étalonnage, nous trouvons les valeurs suivantes:

Conc. mol./l	$5,53 \cdot 10^{-4}$	$1,11 \cdot 10^{-3}$	$1,38 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$
n	2,9	2,84	2,88	2,70

Le coefficient de diffusion D de la tyrosine est probablement plus faible que celui de l'acide picrique. Les valeurs de n seraient donc supérieures à celles que nous donnons.

*2. Par l'expression E = f(i).* Nous avons fait le calcul pour deux courbes polarographiques:

a) id = 9,6  $\mu$ A Conc. = 0,2 g/l E<sub>1/2</sub> = 0,57 v

E	0,40	0,46	0,50	0,54	0,60	0,62	0,68	0,70
i	0,2	1,1	2,1	3,3	6,1	8,1	9,0	9,3
n	0,57	0,44	0,47	0,54	0,48	0,43	0,63	0,67

b) id = 14,1  $\mu$ A Conc. = 0,3 g/l E<sub>1/2</sub> = 0,57 v

E	0,40	0,42	0,46	0,51	0,62	0,64	0,68	0,72	0,74
i	0,25	0,45	1,45	3,4	9,0	10,3	12,6	13,4	13,7
n	0,57	0,55	0,47	0,42	0,36	0,43	0,56	0,54	0,57

Voir aussi fig. 2.

Bien que  $n$  ne représente pas le nombre d'électrons échangés à la cathode, la valeur relativement constante de cette expression prouve là encore que nous sommes en présence d'une réaction simple. Toutes les courbes obtenues, tant pour l'albumine que pour la tyrosine, ne présentent qu'un seul saut. Elles sont plus régulières que celles obtenues par Pearson (loc. cit.) pour les dérivés nitrés du benzène et du toluène.

### C. Etude de la phénylalanine.

La phénylalanine résiste mieux à la nitration que l'albumine et que la tyrosine. Les vagues sont remarquablement bien dessinées (v. p. 1307 fig. 3) et le courant résiduel, souvent si gênant en polarographie organique, est très faible, ce qui permet une mesure très précise des hauteurs. Nous avons étudié ce phénomène en fonction du temps d'une part, en modifiant d'autre part les conditions de nitration. Lorsqu'on fait agir de l'acide sulfurique concentré puis de l'acide nitrique concentré, les résultats ne sont pas satisfaisants, même après plusieurs heures. Le mélange sulfo-nitrique, tel qu'il a été utilisé pour l'albumine, donne des valeurs à peu près reproductibles après 320 min. de nitration. Les résultats les meilleurs ont été obtenus avec un mélange de nitrate de potassium et d'acide sulfurique concentré.

*Mode opératoire.* La nitration par mélange sulfo-nitrique s'effectue comme pour l'albumine. Avec le mélange nitrate de potassium-acide sulfurique, nous avons procédé comme suit: 2 g de nitrate de potassium sont mélangés avec un poids déterminé de phénylalanine. On ajoute 8 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique concentré. Dès cet instant, on procède comme il a été dit pour l'albumine, avec un temps de nitration de 320 minutes.

#### Courbe d'étalonnage de la phénylalanine.

*Conditions de nitration:* nitrate de potassium-acide sulfurique concentré; temps de nitration: 320 minutes; pH = 5.

Cone. g/l . . . . .	0,03	0,05	0,06	0,07	0,10	0,14	0,15	0,3
Conc. mol./l · 10 <sup>-4</sup>	1,81	3,03	3,63	4,23	6,04	8,46	9,07	1,8
i (a) . . . . .	3,45	5,1	6,1	7,5	9,90	13,4	15,1	29,5
K . . . . .	11,3	10	10	10,3	9,70	9,50	9,90	9,90

Ces valeurs sont reportées sur le graphique de la page 1302.

#### Calcul de $n$ .

1. *Par la formule d'Ilkovic.* Les constantes sont:

$$m = 1,73 \text{ mg} \cdot \text{sec.}^{-1} \quad t = 4,32 \text{ sec.} \quad D_{\text{acide picrique}} = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec.}^{-1}$$

Nous trouvons les valeurs suivantes, pour les diverses courbes ayant servi à l'étalonnage:

Conc. mol./l · 10 <sup>4</sup>	1,81	3,03	3,63	4,23	6,06	9,07
n . . . . .	4	3,6	3,6	3,7	3,5	3,55

La valeur choisie pour  $D$  est probablement trop forte.

En comparant ces valeurs à celles obtenues pour la tyrosine, on constate que le rapport des électrons échangés sur la cathode est de  $\frac{2}{3}$  environ. La réduction est donc plus poussée pour la phénylalanine. Il n'est pas impossible, étant donnée l'incertitude qui subsiste sur la valeur du coefficient de diffusion, que les valeurs de  $n$  soient respectivement 4 et 6, valeurs trouvées par Pearson (loc. cit.) pour un grand nombre de dérivés nitrés aromatiques.

2. *Par l'expression  $E = f(i)$ .* Nous avons fait le calcul de  $n$  en divers points de deux courbes.

Courbe 1.

$$E_{\frac{1}{2}} = 0,66 \text{ v} \quad \text{Cone.} = 0,07 \text{ g/l} \quad id = 7,5 \mu\text{a}$$

E	0,43	0,48	0,53	0,60	0,70	0,76	0,80
id	2,6	6	11	22	49,9	63	68
n	0,370	0,348	0,350	0,378	0,430	0,425	0,420

Courbe 2.

$$E_{\frac{1}{2}} = 0,70 \text{ v} \quad \text{Conc.} 0,15 \text{ g/l} \quad id = 15 \mu\text{a}$$

E	0,44	0,50	0,56	0,60	0,66	0,74	0,80	0,86	0,89
id	3,5	11,5	28,5	33,5	53,0	96,6	120	142	147
n	0,368	0,322	0,268	0,294	0,384	0,370	0,370	0,425	0,525

Les valeurs trouvées ne sont pas aussi constantes que celles des composés précédents. La courbe présente une moins grande régularité, et on peut estimer qu'il y a deux pentes caractéristiques.

Pour compléter l'étude des diverses courbes polarographiques, nous avons déterminé  $n$  au point  $E_{\frac{1}{2}}$  pour les trois composés, par la formule de la tangente :

$$\frac{dE}{di} = -\frac{R \cdot T}{n \cdot F} \left( \frac{1}{i} + \frac{1}{id-i} \right) \cdot 0,434 ,$$

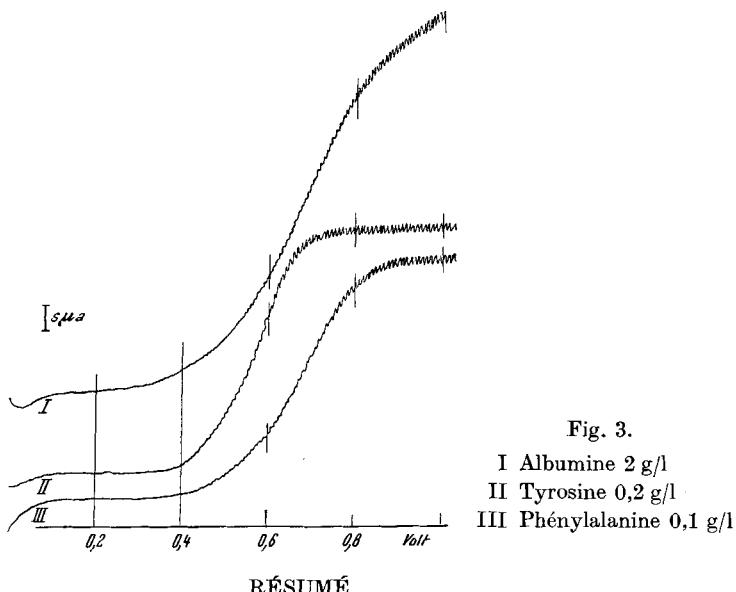
$n$  de l'albumine = 0,30,  $n$  de la tyrosine = 0,50,  $n$  de la phénylalanine = 0,31. Ce sont des valeurs moyennes.

Nous rappelons que dans ce travail tous les potentiels sont donnés par rapport à la surface de mercure dans la cuve (anode). Il ne nous a pas été possible, en utilisant l'électrode de calomel, d'obtenir des courbes reproductibles. De plus, elles sont mal dessinées et ne permettent pas des mesures précises de la hauteur des sauts.

Nous donnons, dans cette publication, les premiers résultats d'une étude systématique que nous allons poursuivre, sur les protéines et leurs constituants, en faisant varier la dénaturation et les conditions de nitration.

Pour le moment, nous constatons que la phénylalanine est plus difficile à nitrer que l'albumine et la tyrosine. Cette dernière se nitre déjà avec de l'acide nitrique dilué (4-n.). Par contre, la réduction de la phénylalanine est plus complète que celle de la tyrosine, ainsi que

l'indiquent les valeurs de  $n$  données par la formule d'*Ilkovic*. Il ne nous est pas encore possible de dire d'une façon certaine quel constituant de l'albumine subit la nitration. Il semble pourtant que les courbes de l'albumine se rapprochent plus de la phénylalanine que celles de la tyrosine (fig. 3), en particulier en ce qui concerne la tangente au point  $E_{1/2}$ , mais ce ne sont que des indices, d'autres essais seront nécessaires pour répondre à cette question. D'autant plus que dans le cas de la phénylalanine, la courbe obtenue permet de supposer que nous sommes en présence d'une réduction en plusieurs temps. Les courbes des deux autres composés étudiés sont plus simples.



#### RÉSUMÉ.

Nous avons entrepris l'étude des dérivés nitrés solubles dans l'éther, provenant de la nitration de l'albumine du sang, de la tyrosine et de la phénylalanine. Nous avons fait varier le pH et la concentration. Les meilleures conditions de nitration ont été recherchées. Les courbes obtenues au polarographe présentent une reproductibilité remarquable, elles ne donnent pratiquement qu'une seule vague, bien dessinée, dont la hauteur est proportionnelle à la concentration. Les courbes d'étalonnage ont été établies pour l'albumine, la tyrosine et la phénylalanine. Les valeurs de  $n$  ont été déterminées par 3 méthodes. Il est possible de doser ces composés isolément avec une précision de 2 à 5 %.

Les conditions de nitration très différentes de l'albumine, de la tyrosine et de la phénylalanine, laissent supposer qu'il sera possible de donner une certaine sélectivité au procédé de dosage décrit.

Laboratoire de Chimie Analytique et de Microchimie,  
Université, Genève.