

Procédé de chromato-électrophorèse permettant d'obtenir la séparation des dinitrophényl-aminoacides hydrosolubles

Si les procédés chromatographiques^{1,2} d'identification des DNP-aminoacides* éthéro-solubles sont parfaitement au point, il n'en est pas de même de ceux qui peuvent s'appliquer à l'analyse des DNP-aminoacides hydrosolubles. Ainsi la caractérisation de ces derniers était, jusqu'ici, une opération analytique délicate malgré les nombreuses méthodes de chromatographie proposées**. Cette analyse est souvent rendue difficile par suite de la présence d'un grand excès de l'un des DNP-dérivés (ϵ -DNP-lysine) et de nombreux artéfacts colorés. Le seul procédé d'analyse satisfaisant était l'électrophorèse sur papier à une dimension dans l'ammoniaque N^3 . Au cours de l'emploi de ce procédé, nous avons été amené à essayer un certain nombre d'amines volatiles ou d'électrolytes alcalins non volatils qui peuvent être avantageusement utilisés à la place de l'ammoniaque. Nous nous proposons de donner ici les positions des DNP-aminoacides hydrosolubles et de quelques artéfacts dans un système de chromato-électrophorèse.

Dans les diagrammes de la Fig. 1, donnant les positions des taches de DNP-aminoacides, la 1-ère dimension (feuille, 39 \times 46 cm, de papier Whatman No. 20) du

TABLEAU I

DISTANCES (Δ) ENTRE LES TACHES D' α -MONO-DNP-ARGININE ET D' ϵ -MONO-DNP-LYSINE APRÈS ÉLECTROPHORÈSE DANS DIVERS ÉLECTROLYTES ALCALINS^a

	Électrolytes	Distance Δ (cm)	Temps	Volts	mA
a	Borax 0.025 M (pH 8.92)	1.4	4h 20	425	12.2
b	Diéthylamine 0.025 M	4.7	4h 25	442	9.2
c	Triéthylamine 0.25 M	4.5	4h 20	442	8.8
d	Ammoniaque 0.25 M	3.2	4h 20	430	11.2
e	Veronal sodé à 0.5 % (pH 9.8)	0.7	4h 30	428	9.2
f	Phosphate trisodique 0.0025 M	1.4	4h 30	448	5.8
g	Acide acétique (0.2 M), Ammoniaque (pH 7.55)	0.3	4h 10	432	9.6
h	Bicarbonate d'ammonium 0.02 M	1.1	3h 31	432	9.2
i	Diéthylamine 0.05 M	4.3	4h 20	445	11.5

^a Électrophorèses réalisées dans un appareil en toit type DURRUM⁴ pour feuille, 39 (largeur) \times 46 cm, de papier Whatman No. 20; ligne de répartition des substances à 11 cm de l'extrémité "catodique" de la feuille; générateur de tension muni d'une valve 5 Z 3 (350 \times 350 Veff), filtre en π ; résistance de 100,000 Ω branchée en parallèle avec la cellule d'électrophorèse à la sortie du générateur.

chromato-électrogramme (pré-équilibré pendant 4 h dans une cuve de 105 l avec 500 ml d'ammoniaque 0.8 N) a été développée (24 h), avec écoulement continu du solvant¹ toluène-chloro-2 éthanol-pyridine-0.8 N ammoniaque (150:90:45:90) (préparé 4 h avant emploi et filtré). Ainsi la tache de dinitroaniline est sortie du chromatogramme,

* Abréviations: DNP = radical 2,4-dinitrophényl; α -Arg = α -mono-DNP-arginine; CySCM = DNP-S-carboxyméthylcystéine ("marqueur"); CySO₃H = acide DNP-cystéique; DNPOH = dinitrophénol ("marqueur"); α -His = α -mono-DNP-histidine; di-His = di-DNP-histidine; H₁ = trace de produit non identifié; α -Lys = α -mono-DNP-lysine; ϵ -Lys = ϵ -mono-DNP-lysine; α -Orn = α -mono-DNP-ornithine; δ -Orn = δ -mono-DNP-ornithine; S₁, S₂, S₃ = artéfacts issus de la S-mono-DNP-cystéine; Taur = DNP-taurine.

** Pour une revue voir réf. 3.

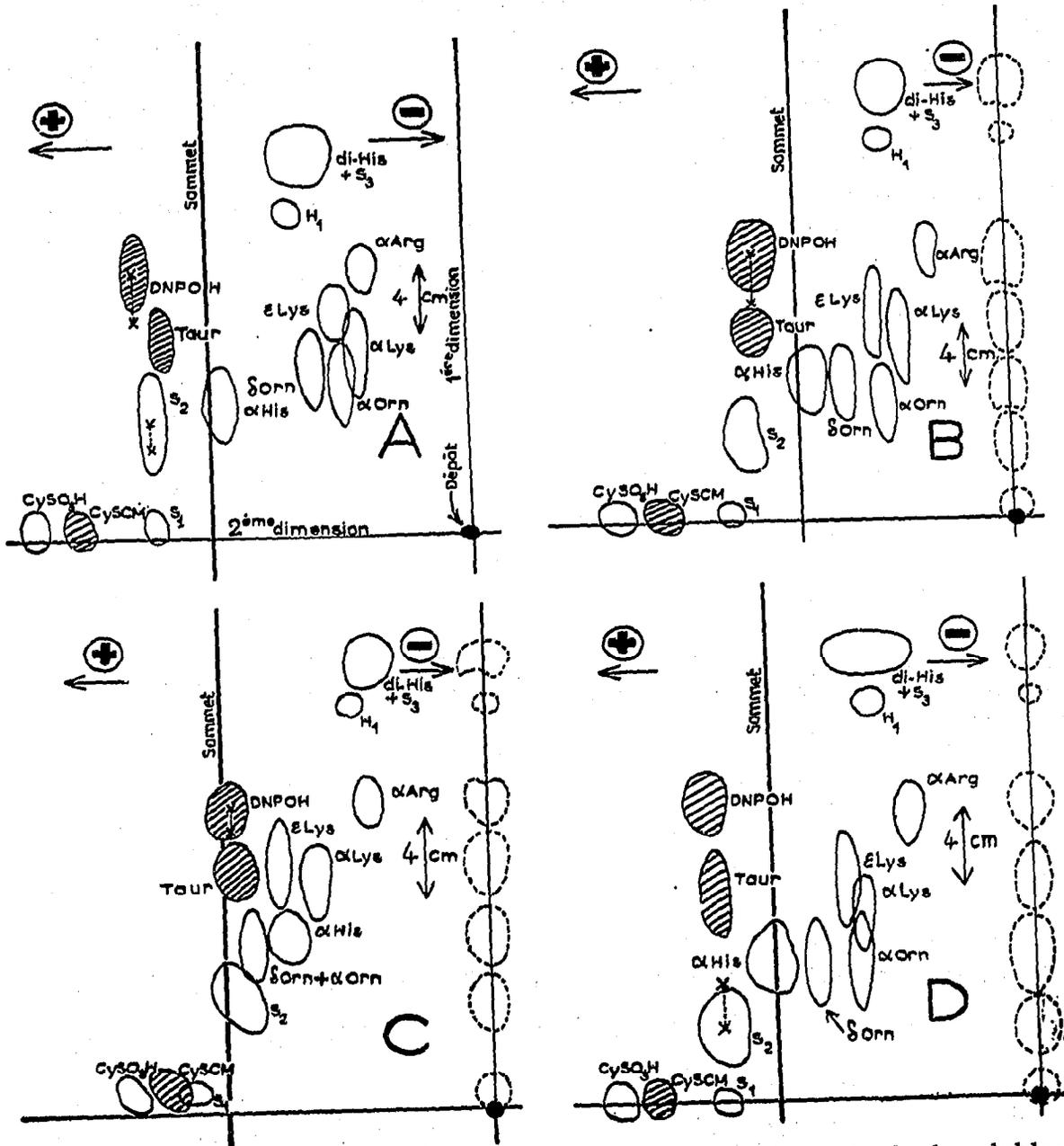


Fig. 1. Diagrammes donnant les positions des taches des DNP-aminoacides hydrosolubles et de quelques artéfacts, après chromato-électrophorèse. 1-ère dimension: chromatographie (conditions opératoires indiquées dans le texte); 2-ème dimension: électrophorèse (durée: 4 h 20 min; conditions opératoires indiquées dans le Tableau I) avec les électrolytes du Tableau I: a en A, b en B, c en C, d en D; en traits interrompus: positions des substances après chromatographie; taches hachurées: position de "marqueurs" facilitant les identifications.

celle de la di-DNP-histidine se situe à 4-6 cm de l'extrémité de la feuille et celles des DNP-aminoacides se trouvent réparties en 5-6 groupes sur une ligne placée à 11 cm du côté catodique. Le chromatogramme sec est disposé pour l'électrophorèse, en seconde dimension, dans les électrolytes dont la composition est indiquée dans le Tableau I.

Comme on peut le voir dans le Tableau I et dans les diagrammes de la Fig. 1, le meilleur système est celui qui utilise la diéthylamine 0.025 M comme électrolyte pour

l'électrophorèse en 2-ème dimension. Le seul inconvénient de ce procédé est la difficulté de mettre en évidence les aminoacides non substitués, par la réaction à la ninhydrine, à cause de la présence de substances donnant une réaction positive à la ninhydrine dans les amines volatiles utilisées et de l'existence d'une large bande d'éthanolamine formée au cours du développement chromatographique en 1-ère dimension*. Sur les diagrammes de la Fig. 1 ont été indiquées les positions des artéfacts (S_1 , S_2 , S_3) issus de la décomposition de la S-mono-DNP-cystéine**. Les deux produits dérivés principaux S_2 et S_3 sont indistingables, par ce procédé d'analyse, respectivement de la N,N'-di-DNP-cystine (pour S_2) et de la N,S-di-DNP-cystéine (pour S_3).

*Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur,
Paris (France)*

ROGER L. MUNIER
GISÈLE SARRAZIN

¹ G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 50.

² A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.

³ G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE ET P. SAUTIÈRE, *Chromatographic Reviews* Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1960, p. 59.

⁴ E. L. DURRUM, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 2943.

⁵ H. ZAHN ET K. TRAUMANN, *Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 518.

Reçu le 10 avril, 1963

* Cette mise en évidence est facile sur les chromato-électrogrammes réalisés avec le système: *n*-butanol-diéthylaminoéthanol-eau (80:5:15) puis diéthylaminoéthanol 0.025 M.

** Produit préparé à pH 5.2 selon réf. 5 et donnant une seule tache, très distincte de celle de la N,N'-di-DNP-cystine et de la N,S-di-DNP-cystéine, par chromatographie dans le système *n*-butanol-acide acétique-eau (70:7:23) puis phénol saturé d'eau; notons que la S-mono-DNP-cystéine est une substance peu stable.

J. Chromatog., 12 (1963) 542-544

An effect of the sample pH on the separation of phosphates by ion-exchange chromatography*

Ion-exchange separation of the acid soluble organic phosphates of protein-free trichloroacetic acid extracts of milk¹ showed in preliminary studies that inorganic orthophosphate was eluted as two peaks if the pH of the extract was 4. If the pH of the extract was adjusted with ammonia to 6.4, the first peak decreased in area while the second increased.

These observations indicated the elution of inorganic phosphate from the ion-exchange resin was dependent on the pH of the sample put on the column, and that orthophosphate could, under certain circumstances, behave as two distinct compounds. Since the effect to our knowledge has not been the subject of previous investigation, this note appeared to be worthwhile.

Potassium dihydrogen phosphate (41 mg) containing 10 mg of phosphorus was dissolved in 10 ml of water. The solution (pH 4.7) was charged to a 25 × 1 cm Dowex

* From the Ph. D. thesis of the author, Massachusetts Institute of Technology. Contribution No. 588 from the Department of Nutrition and Food Science.

J. Chromatog., 12 (1963) 544-546