

AMÉLIORATION D'UN SYSTÈME SOLVANT À HAUT POUVOIR
SÉPARATEUR PERMETTANT L'ANALYSE
CHROMATOGRAPHIQUE SUR PAPIER À DEUX DIMENSIONS DES
MÉLANGES D'AMINO-ACIDES DE GRANDE MOBILITÉ
(ISOLEUCINE, LEUCINE, MÉTHIONINE, PHÉNYLALANINE,
TRYPTOPHANE, TYROSINE, VALINE)

R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN

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

(Reçu le 10 avril, 1963)

Un grand nombre de systèmes solvants ont été proposés pour la chromatographie des aminoacides sur papier. Cependant il n'est pas possible d'obtenir en une seule chromatographie, même à deux dimensions, la séparation *complète* des 18 aminoacides présents dans les hydrolysats de protéines. De plus, en chromatographie à deux dimensions, les aminoacides se répartissent, en général, sur la feuille de papier en deux groupes: celui des aminoacides de faible mobilité et celui des aminoacides de grande mobilité*. En vue de l'emploi de la chromatographie sur papier à l'analyse rapide de la composition en aminoacides des peptides dérivant des protéines, il est nécessaire d'avoir à sa disposition un procédé permettant l'analyse complète de ces deux groupes d'acides aminés. Nous n'envisagerons ici que le problème de la séparation complète des aminoacides de grande mobilité.

MATÉRIEL ET CONDITIONS OPÉRATOIRES

Toutes les chromatographies sont réalisées dans des cuves (105 l) pour 4 feuilles (57 × 47 cm) de papier Whatman No. 4 (surface utile: 43 × 33 cm), par chromatographie descendante avec écoulement continu du solvant (des dents, 2 × 2 cm, sont découpées au bas de la feuille de papier); dans ces conditions la surface sur laquelle peuvent se répartir les taches d'acides aminés est de 43 × 33 cm. Les chromatogrammes sont tous équilibrés avec l'atmosphère de la cuve pendant 4 h avant de démarrer le développement; l'atmosphère de la cuve est créée par le "fond de cuve" constitué par 500 ml de solvant mobile. Ce "fond de cuve" est renouvelé après dix chromatographies.

Les conditions opératoires particulières sont indiquées dans chaque cas, dans les légendes des Figs. 1, 2 et 3.

Les solvants mobiles sont préparés avec des produits purs Prolabo (Paris), excepté l'alcool amylique tertiaire (produit Flucka).

* Pour une revue récente voir réf. 1.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Actuellement, le système solvant présentant le plus haut pouvoir séparateur pour les aminoacides de grande mobilité est celui, imaginé par BOISSONNAS², utilisant respectivement en 1-ère et 2-ème dimension les solvants:

(I) *tert.*-butanol-méthyléthylcétone-eau (4:4:2)

(II) *tert.*-butanol-méthanol-eau (4:5:1),.

Avec ce système solvant, les taches des aminoacides de grande mobilité se répartissent uniformément sur la plus grande partie de la feuille de papier chromatographique* tandis que les autres aminoacides (ceux formant le groupe des aminoacides de faible mobilité) restent près de l'origine. Toutes les taches des aminoacides de grande mobilité sont bien séparées spécialement lorsque le développement du chromatogramme (feuille 57 × 47 cm) est réalisé avec écoulement continu des solvants dans les deux dimensions et en s'aidant d'un marqueur coloré (phénol sulfone phtaléine) de mobilité chromatographique légèrement plus grande que celle de l'acide le plus rapide (ici le groupe leucine + isoleucine)^{1,3,4} (voir Fig. 1).

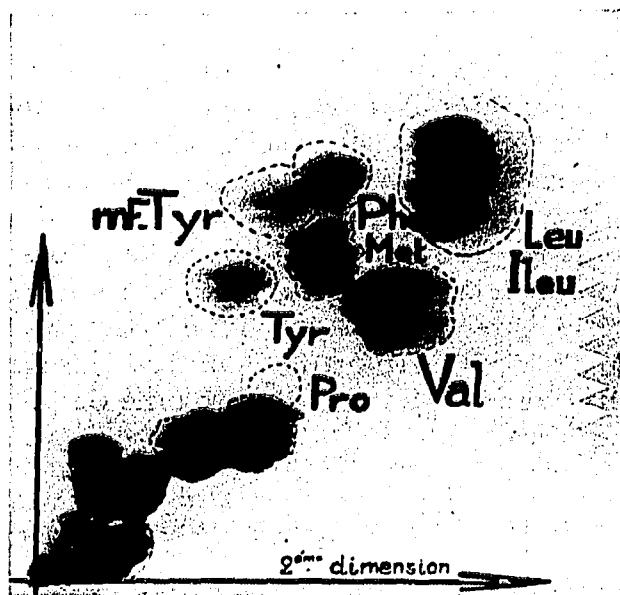


Fig. 1. Séparation chromatographique à deux dimensions des aminoacides de grande mobilité d'un hydrolysate de fraction protéinique principale d'*Escherichia* (100 µg) avec le système solvant (non modifié) DE BOISSONNAS². Feuille (57 × 47 cm) de papier Whatman No. 4 (surface utile: 43 × 33 cm); écoulement continu des solvants dans les deux dimensions suivi grâce au marqueur coloré: phénolsulfone phtaléine; développement en 1-ère dimension: *tert.*-butanol-méthyléthylcétone-eau (4:4:2); en 2-ème dimension: *tert.*-butanol-méthanol-eau (4:5:1). Ileu = isoleucine; Leu = leucine; Met = méthionine; "MeSO ex Met" = fraction de la tache de méthionine oxydée à l'air pendant le séchage (22°) du solvant ayant servi au développement en 1-ère dimension; Phe = phénylalanine; Pro = proline; Tyr = tyrosine; *m*-F-Tyr = *m*-fluorotyrosine; Val = valine.

Cependant, si ce système solvant permet de séparer parfaitement les aminoacides méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, valine et le groupe leucine + isoleucine, ces deux derniers aminoacides sont toujours mêlés. Différents systèmes solvants:

* Pour des améliorations, par les modalités d'emploi, de ce système solvant, voir les réf. 1 (p. 679), 3 et 4.

méthyléthylcétone-pyridine-eau (70:15:15)⁵;
 alcool isoamylique-pyridine-eau (35:35:30)⁶;
 alcool *tert.*-amylique-eau (atmosphère de diéthylamine)⁷;
 méthyléthylcétone-acétone-eau (3:1:0.6)⁸;

peuvent permettre de séparer plus ou moins complètement la leucine de l'isoleucine mais alors les distances entre les diverses taches d'acides aminés de grande mobilité sont moins importantes. Ainsi avons-nous tenté d'apporter diverses modifications au système solvant de BOISSONNAS afin de lui permettre de séparer la leucine de l'isoleucine tout en lui conservant son haut pouvoir séparateur vis à vis des taches des autres acides aminés de grande mobilité (tryptophane, tyrosine, phénylalanine, méthionine, valine)

La Fig. 2(A et B) montre le résultat obtenu lorsque l'on développe le chromato-

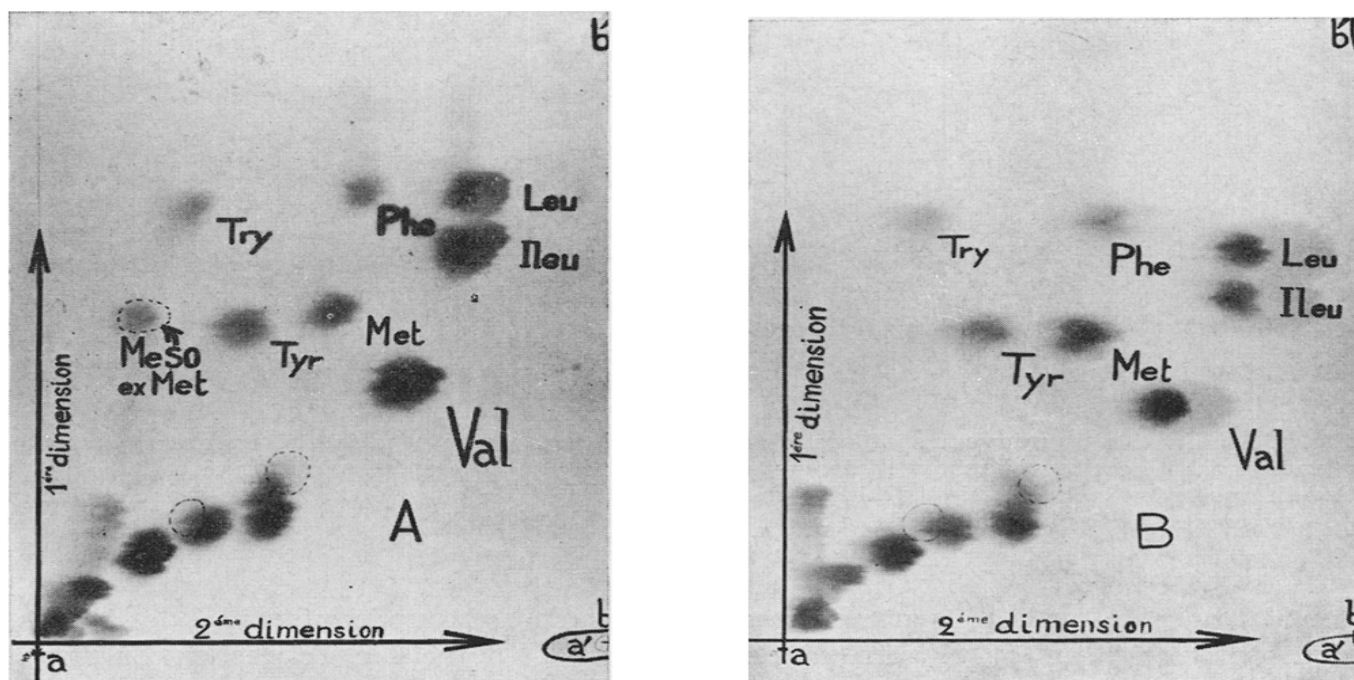


Fig. 2. Nouvelle combinaison de solvants permettant d'obtenir la séparation complète des sept acides aminés de grande mobilité: isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, valine. Feuille (57 × 47 cm) de papier Whatman No. 4 (surface utile: 43 × 33 cm); écoulement continu des solvants dans les deux dimensions suivi grâce aux marqueurs colorés: en 1-ère dimension, méthyl orange III (b = départ; b' = arrivée); en 2-ème dimension, phénol-sulfone phtaléine (a = départ; a' = arrivée); développement en 1-ère dimension: alcool *tert.*-amylique-méthyléthylcétone-eau (6:2:2) pour le chromatogramme A, (4:4:2) pour le chromatogramme B; en 2-ème dimension: *tert.*-butanol-méthanol-eau (4:5:1); quantité d'acide aminé mise en oeuvre: 10 µg par tache.

gramme en 1-ère dimension avec le nouveau solvant (écoulement continu):

(Ia) alcool *tert.*-amylique-méthyléthylcétone-eau (4:4:2) ou (Ib) alcool *tert.*-amylique-méthyléthylcétone-eau (6:2:2) et en 2-ème dimension avec le solvant habituel de BOISSONNAS

(II) *tert.*-butanol-méthanol-eau (4:5:1)*.

* On peut, dans le solvant (II), remplacer le méthanol par de l'éthanol; le pouvoir séparateur du système solvant est conservé mais l'écoulement du solvant est ralenti; le seul avantage du solvant (III) (*tert.*-butanol-éthanol absolu-eau (4:5:1)) réside dans la réduction de sa toxicité par rapport à celle du solvant (II).

Comme on peut le voir dans le chromatogramme de la Fig. 3*, le pouvoir séparateur du nouveau couple de phases solvantes mobiles est encore plus élevé que celui du système solvant original. Les 7 aminoacides de grande mobilité—isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, valine – sont complètement séparés sur un seul et même chromatogramme. L'emploi de marqueurs colorés appropriés (en 1-ère dimension: méthyl orange III; en 2-ème dimension: phénolsulfone phtaléine) de mobilité légèrement plus élevée que celle de l'isoleucine (aminoacide du groupe

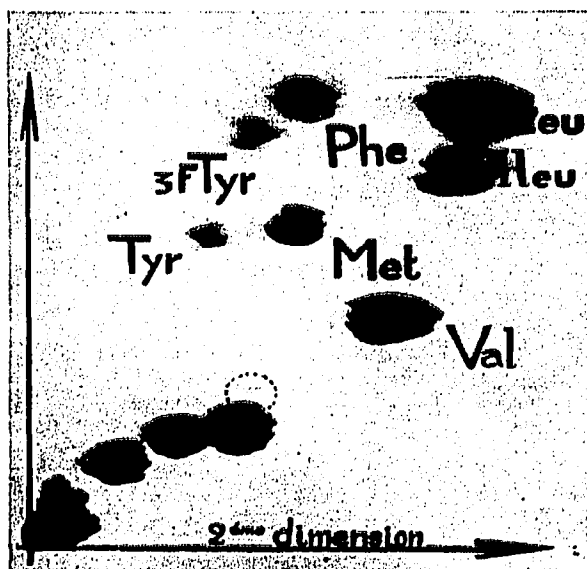


Fig. 3. Application du nouveau système solvant à l'analyse chromatographique des aminoacides de grande mobilité contenu dans un hydrolysate (50 μ g) de la fraction protéinique principale d'*E. coli*⁰. Conditions opératoires identiques à celles de la Fig. 2; noter la séparation complète de la leucine et de l'isoleucine et l'amélioration de la séparation de la phénylalanine de la 3-fluorotyrosine (voir Fig. 1).

dont la mobilité est la plus grande) permet d'améliorer la reproductibilité des séparations obtenues d'un lot à l'autre d'une même qualité de papier. Toutes les conditions opératoires utilisées pour réaliser le développement de ces chromatogrammes sont indiquées dans les légendes des Figs. 2 et 3.

La composition du solvant (Ia, ou Ib) utilisé pour le développement du chromatogramme en 1-ère dimension a été imaginée en tenant compte des observations de WORK⁷ qui a montré que la leucine et l'isoleucine peuvent être séparées par l'alcool *tert.*-amylique saturé d'eau (en atmosphère de diéthylamine); mais nous avons préféré le solvant (Ia) au (Ib) puisqu'on sait¹⁰ que le système précédent n'a pas un très bon pouvoir séparateur pour les autres aminoacides de très grande mobilité et que la diéthylamine¹¹ gêne la révélation des taches d'acides aminés par la ninhydrine.

RÉSUMÉ

Ainsi en modifiant seulement légèrement le système solvant de BOISSONNAS a-t-on pu mettre au point un système solvant à haut pouvoir séparateur pour l'ensemble des 7

* L'hydrolysate analysé dans ce chromatogramme correspond aux protéines de la "fraction protéinique principale" (voir réf. 3) isolées d'*E. coli* ayant incorporé de la 3-fluorotyrosine au cours de sa croissance en présence de cet analogue de la tyrosine⁰.

aminoacides de grande mobilité : isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, valine.

SUMMARY

By modifying the solvent system of BOISSONNAS only slightly, a system was obtained that had a high separating power for the seven amino acids of high mobility, viz. isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine and valine.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. MUNIER, dans J. LOISELEUR, *Technique de laboratoire en chimie physique et chimie biologique*, 3-ème éd., Masson, Paris, 1963, pp. 676-684.
- ² R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1966.
- ³ R. MUNIER, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 524.
- ⁴ R. MUNIER ET G. N. COHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 380.
- ⁵ TH. WIELAND ET L. BAUER, *Angew. Chem.*, 63 (1951) 512.
- ⁶ K. HEYNS ET G. ANDERS, *Z. Physiol. Chem.*, 287 (1951) 16.
- ⁷ E. WORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 400.
- ⁸ G. HÖGSTRÖM, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 743.
- ⁹ R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *Compt. Rend.*, 256 (1963) 3376.
- ¹⁰ R. MUNIER ET G. N. COHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 383 et Fig. 3.
- ¹¹ R. R. REDFIELD, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 344.

J. Chromatog., 13 (1964) 143-147