

blue (if alkaline) on a dark background. The effect of the dimethyl sulfoxide seems to be to intensify weak spots by preventing adsorption of minute amounts of the benzoxazole on the paper (which quenches the fluorescence); it can be replaced by other slightly volatile solvents such as ethylene glycol but not by formamide. Sensitivity varies for various phosphate esters but is of the order of 10 nanomoles of P. If the concentration of benzoxazole is halved or that of ferric ion is doubled the fluorescence of both background and spots is reduced but there is no striking change in sensitivity.

The reaction also detects many other ferric-complexing compounds (such as citric or malic acids) in the 10–100 nanomole range. Heavy metals (such as copper, nickel and cobalt) and substances that absorb long-wave ultraviolet light strongly or quench the benzoxazole fluorescence (such as dinitrophenyl derivatives of amino acids) may show as black spots on the dark blue background. The lack of specificity makes the reaction useless with complex mixtures, and we have applied it primarily to characterize spots which have been through at least one purification step<sup>4</sup>. It is also useful in identifying traces of phosphate esters labeled with <sup>14</sup>C or <sup>32</sup>P; larger amounts of known phosphate esters are added and spots detected with the benzoxazole reagent, and if radioactivity coincides with one of the known spots in several chromatographic or ionophoretic separations the radioactive material is tentatively identified.

The very low reagent concentration in the benzoxazole reaction facilitates recovery of spots from paper. They can be cut out, washed with acetone to remove reagents, extracted in water and run in other solvent systems or subjected to microcolorimetric analysis for phosphate. It is also possible to apply other reagents, such as ninhydrin, to ferric-benzoxazole-treated chromatograms or ionograms without serious interference.

*Division of Entomology and Acarology, University of California,* H. T. GORDON  
*Berkeley, Calif. (U.S.A.) and Biological Research Laboratory,* L. N. WERUM  
*California Packing Corporation, Emeryville, Calif. (U.S.A.)* W. W. THORNBURG

<sup>1</sup> C. S. HANES AND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.

<sup>2</sup> H. E. WADE AND D. M. MORGAN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 264.

<sup>3</sup> R. G. CHARLES AND H. FREISER, *Anal. Chim. Acta*, 11 (1954) 1.

<sup>4</sup> H. T. GORDON, W. W. THORNBURG AND L. N. WERUM, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 44.

Received May 5th, 1963

*J. Chromatog.*, 13 (1964) 272–273

### Comportement de peptides de l'acide meso- $\alpha,\alpha'$ -diaminopimélique au cours de leur chromatographie sur papier \*

RHULAND *et al.*<sup>1</sup> avaient constaté que l'acide  $\alpha,\alpha'$ -diaminopimélique, après chromatographie sur papier dans un mélange méthanol–pyridine–acide chlorhydrique 10*N*–eau (80:10:2.5:17.5, v/v) se différencie des autres acides aminés de deux manières: d'une part, il donne, avec la ninhydrine, une coloration vert-olive qui vire avec le

\* 4ème Communication sur les peptides de l'acide  $\alpha,\alpha'$ -diaminopimélique; 3ème communication, voir réf. 4. Ce texte a fait l'objet d'une Communication à la Réunion du Groupe d'Étude de la Chromatographie de la Société Chimique de France, le 31 mai 1963.

*J. Chromatog.*, 13 (1964) 273–275

temps en jaune et, d'autre part, il se dédouble en deux taches distinctes, l'une correspondant à la forme DD et l'autre à son antipode LL, la forme *meso* ayant le même  $R_F$  que la forme DD.

On peut se demander si l'on retrouve chez les peptides de l'acide  $\alpha, \alpha'$ -diaminopimélique cette même particularité de l'acide libre au cours de leur chromatographie sur papier.

L'obtention des divers peptides de l'acide *meso*- $\alpha, \alpha'$ -diaminopimélique (*meso*-DAP) soit par synthèse chimique<sup>2</sup>, soit par l'action de peptidases sur des peptides synthétiques<sup>3,4</sup> nous a donné l'occasion d'étudier leur comportement chromatographique. Dans le Tableau I nous avons résumé les constatations concernant les colorations obtenues avec la ninhydrine pour un certain nombre de ces peptides. D'après ces résultats, l'apparition d'une coloration verte est caractéristique (i) de la présence sous forme non substituée des deux fonctions  $\alpha$ -amine du DAP et (ii) de la présence d'au moins une fonction carboxyle libre, la seconde pouvant être substituée.

L'intérêt pratique de ces constatations est évident pour la caractérisation des peptides du *meso*-DAP que l'on obtient par hydrolyse acide partielle d'une chaîne peptidique provenant par exemple de la paroi bactérienne d'*Escherichia coli* et de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>5-7</sup>; en effet, il suffit d'effectuer une chromatographie de ces peptides dans le mélange de RHULAND *et al.*<sup>1</sup> pour déceler, après coloration à la ninhydrine, la présence éventuelle, parmi eux, de peptides ayant en position N-terminale le *meso*-DAP, étant entendu que les deux fonctions amines sont libres et une des fonctions carboxyles impliquée en liaison peptidique.

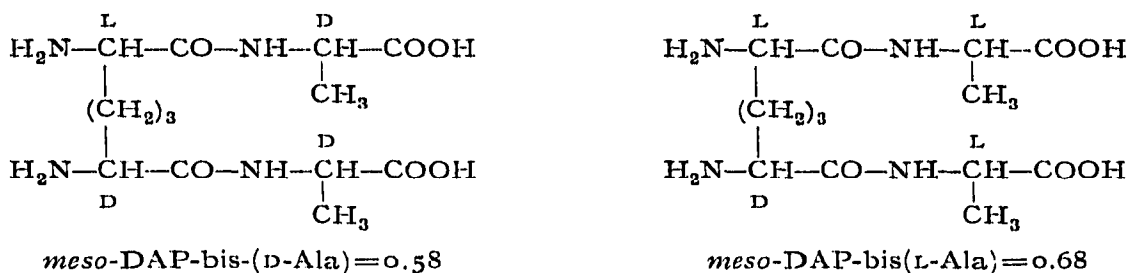
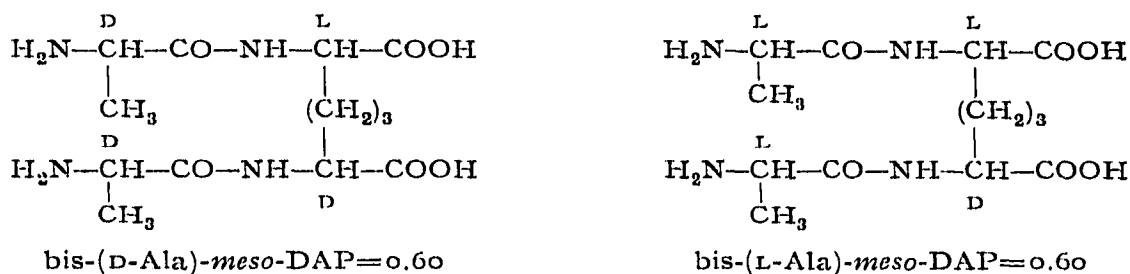
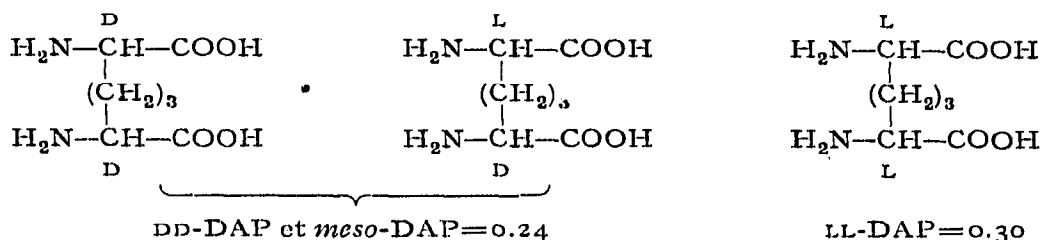
Dans le Tableau II nous avons indiqué les valeurs des  $R_F$  après chromato-

TABLEAU I

COLORATION À LA NINHYDRINE APRÈS DÉVELOPPEMENT DANS LE MÉLANGE: MÉTHANOL-PYRIDINE-HCl 10N-EAU (80:10:2.5:17.5)

$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ (\text{CH}_2)_3 \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	vert-olive → jaune	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ (\text{CH}_2)_n \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	$n=2$ $n=4$	} violette
$\begin{array}{c} \text{L} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ (\text{CH}_2)_3 \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{Y} \\   \\ \text{D} \end{array}$	vert-olive ↓ jaune	$\begin{array}{c} \text{L} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{Y} \\   \\ (\text{CH}_2)_3 \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{Y} \\   \\ \text{D} \end{array}$		violette
$\text{Y} = \begin{cases} -\text{NH}_2 \\ \text{L-Ala} \\ \alpha\text{-L-Glu-D-Ala} \end{cases}$		$\begin{array}{c} \text{L} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ (\text{CH}_2)_3 \\   \\ \text{X}-\text{HN}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{D} \end{array}$		violette
		$\begin{array}{c} \text{L} \\   \\ \text{X}-\text{HN}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ (\text{CH}_2)_3 \\   \\ \text{X}-\text{HN}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{D} \end{array}$		violette
		$\text{X} = \begin{cases} \text{L-Ala} \\ \alpha\text{-L-Glu} \end{cases}$		

TABLEAU II

VALEURS DES  $R_F$  DANS LE MÉLANGE RHULAND *et al.* (WHATMAN NO. 1)

graphie dans le mélange précédent de quatre peptides du *meso*-DAP et de la D- et L-alanine, deux à deux énantiomorphes; à titre de comparaison sont donnés aussi les  $R_F$  des trois formes du DAP libre. On constate que les deux peptides énantiomorphes ayant les deux fonctions amines du DAP libres migrent avec des vitesses différentes et que le peptide *meso*-DAP-bis-(L-alanine) possède un  $R_F$  plus grand que son antipode *meso*-DAP-bis-(D-alanine). Cette différence de  $R_F$  est comparable à celle que l'on observe entre les formes DD et LL du DAP libre.

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,  
Paris (France)

EVANGHÉLOS BRICAS  
CLAUDE NICOT

- <sup>1</sup> L. E. RHULAND, E. WORK, R. F. DENMAN ET D. S. HOARE, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 4844.
- <sup>2</sup> E. BRICAS, C. NICOT ET J. VAN HEIJENOORT, *Compt. Rend.*, 254 (1962) 1685.
- <sup>3</sup> E. BRICAS, C. NICOT ET E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 1115.
- <sup>4</sup> C. NICOT ET E. BRICAS, *Compt. Rend.*, 256 (1963) 1361.
- <sup>5</sup> J. KARA ET B. KEIL, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 23 (1958) 139.
- <sup>6</sup> P. JOLLES, H. NGUYEN-TRUNG-LUONG-CROS ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 559.
- <sup>7</sup> H. PELZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 229.

Reçu le 4 juin 1963