

Séparation des acides aminés par chromatographie en couche mince de diéthylaminoéthyl-cellulose

Depuis l'introduction par STAHL¹ de la chromatographie en couche mince dans la pratique courante cette méthode s'est rapidement imposée dans divers domaines de la chimie analytique^{2,3}. L'avantage de cette technique est son caractère micro-analytique – des quantités de l'ordre de 0.5 μg d'un aminoacide peuvent être révélées – et sa rapidité d'exécution.

Plusieurs supports ont été proposés pour la séparation des acides aminés : alumin⁴, silicagel⁵, cellulose⁶ et dextranes^{7,8}.

Dans la présente note, nous apportons quelques résultats obtenus dans la séparation des aminoacides en couche mince de diéthylaminoéthyl (DEAE)-cellulose. Ce support a été déjà utilisé par KNIGHT^{9,10} sous forme de papier avec des tampons aqueux comme liquides de développement. La chromatographie sur DEAE-cellulose, appliquée en couche mince sur une plaque de verre et avec des solvants organiques comme moyen de développement, permet la séparation de tous les aminoacides courants avec la même simplicité et rapidité que sur d'autres supports. De plus, sur DEAE-cellulose, la ninhydrine donne avec certains aminoacides des colorations spécifiques permettant de les identifier facilement; d'autre part la sensibilité de la révélation par ce réactif atteint 0.05 μg pour la plupart de ces derniers.

Partie expérimentale

Préparation des plaques. La dimension des plaques de verre est de 20 \times 20 cm et accessoirement de 13 \times 16 cm. Le nettoyage préalable de ces plaques par un détergent tout d'abord, par la soude caustique ensuite, est indispensable pour obtenir une bonne adhérence du support.

La DEAE-cellulose est une préparation MN 300 DEAE*. Selon les indications du fabricant, on mélange 8 g de poudre MN 300 DEAE avec 2 g de poudre MN 300 (poudre de cellulose) et 90 ml d'eau distillée. La suspension peut être étalée sur la plaque, soit au moyen d'un appareil approprié, soit simplement au moyen d'une spatule. La fluidité de la suspension permet en effet, en inclinant rapidement la plaque tenue sur une main, tantôt d'un côté tantôt de l'autre, d'obtenir un étalement régulier de la couche. Les plaques sont séchées à température ambiante sur une surface parfaitement horizontale.

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsqu'on lave la chromatoplaque au préalable en faisant une "chromatographie à blanc" dans le système de solvants utilisé. Quand le solvant atteint le bord supérieur de la chromatoplaque, on la sèche, et après l'application des échantillons à analyser, on l'utilise dans le même sens qu'au cours du lavage. Ce traitement préalable s'avère indispensable pour les systèmes de solvants contenant comme composant un acide organique; dans ce dernier cas, la DEAE-cellulose doit être saturée par l'acide. Le traitement indiqué ci-dessus peut être remplacé par un lavage rapide de la chromatoplaque au moyen d'une solution de l'acide à 20% dans le méthanol.

Les échantillons à analyser sont appliqués de la manière habituelle. Des quantités

* Ets. Macherey, Nagel & Co, Düren, Allemagne.

comprises entre 0.05 et 2 μg de chaque aminoacide peuvent être utilisées. Les points d'application des échantillons doivent être soigneusement séchés.

Le développement se fait toujours dans le sens ascendant. On peut prolonger la chromatographie en adaptant sur le bord supérieur de la chromatoplaque une bande de papier Whatman No. 1 de la même largeur. Cette bande est appliquée contre la couche au moyen d'une plaque de verre de 3×20 cm, tenue à ses deux bords par des pinces à dessin. La bande de papier qui prolonge ainsi la couche, passe sous le couvercle et sort de la cuve de chromatographie sur une longueur de quelques centimètres. Ce dispositif permet l'évaporation du solvant au fur et à mesure qu'il arrive dans cette zone.

Il est possible de faire la chromatographie bidimensionnelle sur ce support à condition d'utiliser soit une paire de systèmes ne contenant pas d'acide, soit deux systèmes successifs contenant comme composant le même acide.

Solvants. Parmi la douzaine de systèmes de solvants examinés, 9 ont été retenus:

1. Propanol-ammoniaque 2 *N* (80:20, v/v). Pour éviter que certains acides aminés ne donnent deux taches (leucine, phénylalanine, etc.), avant le développement la chromatoplaque doit être passée au-dessus d'un flacon d'ammoniaque concentrée, ou bien équilibrée pendant 1 ou 2 h dans la cuve avec les vapeurs des solvants utilisés. L'emploi du butanol à la place du propanol donne le même type de séparation entre les acides aminés mais avec des R_F plus petits.

2. Isopropanol-ammoniaque 2 *N* (80:20, v/v). Mêmes précautions que pour système 1.

3. Butanol secondaire-butanol tertiaire-méthyléthylcétone-eau (1:1:1:1, v/v), en présence de 0.5 % de diéthylamine. Les mêmes précautions que pour système 1.

4. Pyridine-eau (80:20, v/v). Le lavage préalable de la chromatoplaque par le système de développement, ainsi que nous l'avons indiqué ci-dessus, est recommandé afin d'éviter des traînées.

5. Méthanol-pyridine-eau (80:4:20, v/v).

6. Butanol-acide acétique-eau (4:1:5, v/v), phase supérieure. Le traitement préalable de la chromatoplaque par le système de développement, ou bien par le méthanol contenant 20% d'acide acétique est indispensable (voir ci-dessus).

7. Méthyléthylcétone-pyridine-acide acétique-eau (70:15:2:15, v/v). Voir système 6 pour le traitement préalable de la chromatoplaque.

8. Pyridine-acide acétique-eau (30:10:7, v/v). Voir système 4 pour le traitement préalable de la chromatoplaque.

9. Méthanol-pyridine-acide acétique-eau (80:4:1:20, v/v). Voir système 6 pour le traitement préalable de la chromatoplaque.

Valeurs R_F . Dans le Tableau I nous avons réuni les R_F des aminoacides dans les solvants cités ci-dessus. Pour faciliter la comparaison entre les R_F obtenus dans les divers solvants, nous avons préféré disposer les aminoacides dans l'ordre dans lequel ils apparaissent en général sur une chromatoplaque (l'ordre des R_F décroissants).

Discussion

La chromatographie des aminoacides en couche mince de DEAE-cellulose présente quelques avantages sur celles utilisant d'autres supports: elle apparaît plus sensible et permet l'obtention de colorations spécifiques pour certains aminoacides révélés à la ninhydrine, ce qui facilite leur identification. Il semble que cette coloration spécifique

TABLEAU I

VALEURS R_F ET COLORATIONS À LA NINHYDRINE DES AMINOACIDES SUR COUCHE MINCE DE DEAE-CELLULOSE
(Voir le texte pour la composition des systèmes de solvants. Une flèche indique que la coloration primitive évolue après quelques heures.)

Acide aminé	$R_F \times 100$ et la coloration à la ninhydrine*									
	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_{10}
DL-Leucine	52 (b.)	46 (vi.)	42 (b.)	54 (b.)	75 (b.)	55 (vi.)	36 (vi.)	65 (vi.)	70 (b.)	
L-(+)-Isoleucine	48 (b.)	40 (vi.)	39 (b.)	53 (b.)	73 (b.)	51 (vi.)	31 (vi.)	63 (vi.)	70 (b.)	
L-(+)-Phénylalanine	44 (b.g.)	35 (vi.g.)	40 (g.f.)	52 (b.g.)	62 (vi.g.)	45 (vi.r.)	42 (vi.r.)	61 (vi.g.)	62 (b.g.)	
L-(+)-Valine	40 (b.vi.)	33 (vi.)	28 (b.)	45 (vi.)	69 (b.)	39 (vi.)	21 (vi.)	56 (vi.)	66 (b.)	
L-(+)-Méthionine	35 (b.)	29 (vi.)	30 (b.)	48 (b.vi.)	62 (b.)	37 (vi.)	30 (vi.)	52 (vi.b.)	59 (b.)	
DL-Proline	30 (j.→v.→g.)	27 (j.→v.→g.)	22 (j.)	33 (j.)	66 (j.)	26 (j.)	14 (j.→v.→g.)	36 (j.)	58 (j.)	
L-(+)-Tryptophane	28 (b.g.)	—	35 (b.g.)	46 (b.)	—	36 (vi.g.)	—	—	45 (b.g.)	
L-(+)-Tyrosine	22 (b.g.)	—	28 (b.g.)	48 (b.)	61 (b.)	29 (vi.g.)	31 (vi.g.)	57 (vi.)	54 (b.g.)	
L-(+)-Alanine	22 (b.vi.)	20 (vi.)	17 (b.)	30 (vi.)	55 (b.)	23 (b.vi.)	10 (vi.)	36 (vi.)	57 (b.)	
DL-Thréonine	14 (b.vi.)	17 (vi.)	22 (b.)	33 (vi.)	55 (b.)	19 (b.vi.)	11 (vi.)	38 (vi.)	50 (b.)	
DL-Sérine	11 (b.vi.)	8 (vi.)	11 (b.vi.)	28 (vi.)	50 (b.)	14 (b.vi.)	5 (vi.)	26 (b.)	45 (b.)	
L-(+)-Glutamine	8 (b.vi.)	20 (vi.)	11 (vi.)	21 (vi.)	47 (vi.)	15 (b.vi.)	6 (vi.)	26 (b.vi.)	43 (b.)	
L-(+)-Glutamique (acide)	2 (b.r.)	3 (b.r.)	2 (b.r.)	0 (b.r.)	3 (b.)	14 (b.r.)	0 (b.)	26 (b.)	14 (b.r.)	
Glycocolle	12 (g.→g.vi.)	11 (b.g.)	10 (g.f.)	18 (b.g.)	47 (b.g.)	17 (g.b.)	7 (g.)	22 (g.b.)	42 (b.g.)	
L-(+)-Histidine·HCl	10 (vi.g.)	11 (vi.g.)	11 (g.)	21 (vi.br.)	41 (vi.g.)	22 (vi.g.)	4 (vi.r.)	22 (vi.g.)	48 (vi.g.)	
L-(+)-Arginine·HCl	14 (vi.)	10 (vi.)	11 (vi.)	27 (vi.)	71 (vi.)	24 (vi.)	4 (vi.)	23 (vi.)	62 (vi.)	
L-(+)-Lysine·HCl	11 (vi.)	11 (vi.)	6 (vi.)	16 (vi.)	69 (vi.)	20 (vi.)	2 (vi.)	18 (vi.)	60 (vi.)	
L-(+)-Asparagine	7 (o.)	7 (o.→br.)	8 (o.)	16 (o.)	36 (o.)	13 (o.)	5 (o.)	18 (o.)	36 (o.)	
L-(+)-Aspartique (acide)	2 (b.o.)	3 (b.o.)	4 (b.o.)	0 (b.o.)	2 (v.→b.o.)	9 (v.→b.o.)	0 (v.→b.o.)	7 (v.→b.o.)		
L-(+)-Cystine	1 (b.g.)	—	—	—	—	6 (b.g.)	—	—	—	

* Les symboles suivants ont été adoptés pour désigner les couleurs: b. = bleu; b.g. = bleu gris; b.o. = bleu d'outre-mer; b.r. = bleu roi; b.vi. = bleu violacé; br. = brun; g. = gris; g.f. = gris foncé; g.vi. = gris violacé; j. = jaune; o. = orange; v. = vert; vi. = violet; vi.b. = violet bleu; vi.br. = violet brun; vi.g. = violet gris; vi.r. = violet rose.

soit due à la présence dans la DEAE-cellulose d'un groupe aminé substitué. En effet, des colorations spécifiques sont également observées sur un support formé par l'épichlorhydrine triéthanolamine (ECTEOLA)-cellulose, alors qu'elles ne le sont pas dans le cas des supports cellulose ne contenant pas de groupes aminés (CM-cellulose) (résultats non publiés).

*Laboratoire de Morphologie Expérimentale
et Endocrinologie, Collège de France, Paris (France)*

PEDRO DE LA LLOSA
COLETTE TERTRIN
MARIAN JUTISZ

- ¹ E. STAHL, *Chemiker Ztg.*, 82 (1958) 232.
- ² E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.
- ³ M. JUTISZ ET P. DE LA LLOSA, *Bull. Soc. Chim. France*, (1963) 2913.
- ⁴ M. MOTTIER, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 49 (1958) 454.
- ⁵ A. F. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI ET M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.
- ⁶ P. WOLLENWEBER, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 369.
- ⁷ H. DETERMANN, *Experientia*, 18 (1962) 430.
- ⁸ T. WIELAND ET H. DETERMANN, *Experientia*, 18 (1962) 431.
- ⁹ C. S. KNIGHT, *Nature*, 194 (1962) 90.
- ¹⁰ C. S. KNIGHT, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 205.

Reçu le 22 juillet 1963

J. Chromatog., 14 (1964) 136-139

The use of Sephadex G-25 in partition column chromatography

Cellulose powder column chromatography has been used for the separation of a variety of materials, *i.e.* sugars and amino acids. However, it has not always been as successful in resolution as might have been predicted from the results obtained with paper sheet chromatography. The main difficulty has been the packing of a uniform column. Modifications have been made in the preparation of the cellulose, as well as the use of other column materials such as starch, but these also suffer from the problem of preparing columns which will give reproducible results.

Sephadex, a cross-linked dextran (obtained from Pharmacia, Inc. as Sephadex G-25); has been used very successfully in the fractionation of various biological materials according to their molecular size¹. This cross-linked dextran has not been as useful for the fractionation of mixtures of individual monosaccharides or amino acids by what is essentially adsorption chromatography².

We have used Sephadex G-25 partition column chromatography to separate mixtures of sugars, amino acids and to some extent a purine and a nucleoside. The method utilizes various solvent mixtures previously used for paper partition chromatography of the materials to be separated.

Experimental

The solvents used were: solvent A, butanol-1-acetic acid-water, 62:15:25 (by volume) and solvent B, ethanol-1 M ammonium acetate pH 7.5, 7:3 (by volume). To prepare the columns, 5-10 g of dry Sephadex G-25 powder was stirred for 18-24 h with