

CHROMATOGRAPHIE À DEUX DIMENSIONS DES DINITROPHÉNYL-AMINOACIDES ÉTHÉROSOLUBLES ET CHROMATO-ÉLECTROPHORÈSE DES DNP-AMINOACIDES HYDRO-ACIDO-SOLUBLES, EN COUCHE MINCE DE POUDDRE DE CELLULOSE*

ROGER L. MUNIER ET GISÈLE SARRAZIN

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

(Reçu le 14 juillet 1965)

On sait qu'après transformation en 2,4-dinitrophényl-dérivés, il est extrêmement aisé de doser les aminoacides contenus dans les hydrolysats de protéines et de peptides grâce aux excellents procédés de séparation chromatographique sur papier décrits pour ces substances (BISERTE ET OSTEUX¹, LEVY², MUNIER ET SARRAZIN³). Les méthodes de la chromatographie sur papier exigent cependant un matériel encombrant, coûteux, et la mise en oeuvre d'une quantité relativement importante de produit. Lorsqu'il s'agit de procéder à un grand nombre de dosages, d'identifications des constituants des mélanges, il devient souhaitable de s'adresser aux techniques de la chromatographie en couche mince. Malheureusement ces techniques n'ont été développées pour les DNP-aminoacides que sur couche mince de gel de silice⁵ et avec des combinaisons de solvants différentes de celles employées en chromatographie sur papier. Il était, à priori, intéressant de chercher à transposer les méthodes décrites pour la chromatographie sur papier à la chromatographie sur couche mince de poudre de cellulose. Ainsi pouvait-on espérer obtenir des résultats comparables par les deux méthodes.

Comme nous allons le montrer, l'application directe des conditions opératoires utilisées en chromatographie sur papier ne permet d'obtenir aucune séparation satisfaisante des DNP-aminoacides sur couche mince de poudre de cellulose. Après une étude des causes d'insuccès (trop faible conductibilité des électrolytes, trop faible teneur en NH₃ de l'atmosphère des cuves, trop lente élimination du solvant de déve-

* Abréviations utilisées: DNP = radical 2,4-dinitrophényl; Ala = DNP-alanine; β -Ala = DNP- β -alanine; α -Arg = N- α -mono-DNP-arginine; Asp = DNP-acide-aspartique; Asp-NH₂ = DNP-asparagine; CySCM = S-carboxyméthyl-cystéine; CySCM-O = produit d'oxydation à l'air de la S-carboxyméthyl-cystéine; CySO₃H = acide-DNP-cystéique; di-His = di-DNP-histidine; di-Lys = di-DNP-lysine; di-Tyr = di-DNP-tyrosine; DNP-NH₂ = dinitro-aniline; DNP-OH = dinitrophénol; Etio = DNP-éthionine; "EtSO ex Etio" = artefact: fraction de la tache de DNP-éthionine transformée en DNP-éthionine sulfoxyde pendant le séchage du solvant de 1-ère dimension; Glu = acide-DNP-glutamique; Glu NH₂ = DNP-glutamine; Gly = DNP-glycocolle; Ileu = DNP-isoleucine; Leu = DNP-leucine; ϵ -Lys = ϵ -mono-DNP-lysine; Met = DNP-méthionine; "MeSO ex Met" = artefact: fraction de la tache de DNP-méthionine transformée en DNP-méthionine sulfoxyde pendant le séchage du solvant de 1-ère dimension; Me SO₂ = DNP-méthionine sulfone; N- α -mono His = N- α -mono-DNP-histidine; N-mono Tyr = N- α -mono-DNP-tyrosine; Nor leu = DNP-norleucine; Nor val = DNP-norvaline; *p*-F Phe = DNP-*p*-fluorophényl-alanine; Phe = DNP-phényl-alanine; Pro = DNP-proline; Ser = DNP-sérine; Thr = DNP-thréonine; Try = DNP-tryptophane; Val = DNP-valine.

l'oppression en 1-ère dimension, "dissociation capillaire" des constituants du mélange solvant au cours de son cheminement, rétention excessive des constituants du solvant de 1-ère dimension dans la couche de cellulose etc.) nous avons mis au point des conditions opératoires permettant d'obtenir la séparation de l'ensemble des DNP-aminoacides éthero-solubles, des DNP-aminoacides de faible mobilité (y compris DNPS-carboxyméthyl-cystéine, acide DNP aspartique, acide DNP-glutamique, DNP-asparagine, DNP-glutamine), des DNP-aminoacides hydro-acido-solubles (ϵ -mono-DNP-lysine, α -DNP-arginine, di-DNP-histidine, α -mono-DNP-histidine, acide-DNP cystéique). Les méthodes expérimentales décrites permettent de réaliser simultanément jusqu'à 20 chromatogrammes sur un plan de travail d'un quart de mètre carré avec des quantités de l'ordre de 3 à 7 m μ moles de chaque DNP-aminoacide par chromatogramme.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Préparation des couches minces

Les couches minces (250 μ) de poudre de cellulose (sans liant) utilisées, sont formées par étalement uniforme d'une bouillie épaisse sur plaque de verre [200 \times 200 (ou 400) \times 4 mm] à l'aide du dispositif de STAHL¹. La poudre de cellulose, mise en suspension dans l'eau, est homogénéisée par passage, pendant quelques secondes, dans un mélangeur type Turmix. La bouillie, versée dans un erlenmeyer, est dégazée par agitation sous vide (produit par une trompe à eau) puis est rapidement versée dans l'étaleur; les couches minces sont immédiatement formées de la manière habituelle puis placées sur une surface plane et séchées (une nuit) à la température de la pièce. Pour une proportion correcte de poudre de cellulose et d'eau (de l'ordre de 15 g pour 90 à 85 ml), à déterminer pour chaque lot de poudre, on obtient des couches lisses et adhérant fortement à la plaque de verre. Un léger excès de cellulose donnerait des couches dont la surface serait granuleuse; un léger excès d'eau entraînerait la formation de couches minces assez peu résistantes (entraînement assez facile des particules superficielles par passage d'un doigt). Avant emploi, les bords de la couche mince sont éliminés (bande de 1 cm de largeur) sur trois côtés. Le quatrième bord de la couche mince ne sera éliminé qu'avant le développement du chromatogramme en 2-ème dimension; dans toutes les figures, les bords de la plaque de verre sont indiqués par un trait plein, ceux de la couche mince par des tirés et points alternés.

Produits utilisés

Alcool octylique primaire (purifié, Prolabo), alcool octylique normal secondaire (Prolabo), alcool laurique (alcool C12 chimiquement pur, Firmenich et Cie, Genève), dodecylsulfate de sodium (pur, Serlabo), monochlorhydrine du glycol (purifiée, Prolabo), diéthylamine anhydre (Eastman Kodak), Tween 20,80, Brij 35 (Atlas Powder Co., Wilmington, U.S.A.), poudre de cellulose (taille moyenne des grains: 10 μ) sans liant No. MN300 (Macherey et Nagel Co.); aucun des solvants commerciaux utilisés (pyridine pure, toluène pur, monochlorhydrine du glycol purifiée) n'ont besoin d'être redistillés; pour les DNP-aminoacides utilisés voir la référence 3.

Préparation des phases solvantes mobiles

Le solvant "toluène"¹ est préparé, 4 h avant son emploi de la manière habituelle:

toluène-monochlorhydrine du glycol-pyridine-ammoniaque 0.8 N (150:90:45:90). Juste avant usage, il est passé sur deux filtres de papier plissé de taille appropriée. Dans les conditions opératoires qui nous ont donné satisfaction, la totalité du solvant (correspondant à 150 ml de toluène) obtenu après filtration est additionnée de 10 à 12 gouttes d'alcool octylique primaire (pipette compte-gouttes délivrant 1 ml d'eau en 20 gouttes à 22°)*.

Les solvants utilisés pour la chromatographie de relargage sont:

- (a) Tampon $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}-\text{NaPO}_4\text{H}_2$ (0.75 M en PO_4^{3-}), pH 6.0.
- (b) Eau saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -eau saturée de NaCl-eau (1:1:6).
- (c) Eau saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -eau (1:4), pH 5.5.
- (d) Eau saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -eau (1:7 ou 1:9).
- (e) Solution aqueuse 0.75 M en $\text{NaPO}_4\text{H}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.
- (f) Eau saturée de Na_2SO_4 -eau saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -eau (10:2:18).
- (g) Eau saturée de Na_2SO_4 -eau (2:1).
- (h) Eau saturée de Na_2SO_4 -eau (4:1).
- (i) Eau saturée de NaCl-eau (1:5).

Dans les conditions opératoires qui ont donné de bons résultats:

les solutions a, c, e, g, i, étaient saturées de dodécylsulfate de sodium (concentration $< 0.0025 \text{ M}$);

les solutions b, d, f, h, étaient 0.0025 M en dodécylsulfate de sodium.

Dans le cas de la chromatographie des DNP-aminoacides de faible mobilité (dans le solvant "toluène"), le chromatogramme est imprégné d'acétate de sodium [pulvérisation d'une solution 0.2 M en acétate de sodium dans un mélange alcool-eau (6:4)] puis séché (90°, quelques minutes) *rapidement* avant développement en 2-ème dimension [solvant: isobutanol-acide acétique glacial-eau (100:4:20)].

Préparation des solutions d'électrolytes et conditions d'électrophorèse

Pour l'électrophorèse des DNP-aminoacides hydrosolubles, une solution aqueuse de diéthylamine (0.033 M) et de chlorure de sodium (0.02 M) est utilisée. Après séchage du solvant de 1-ère dimension (un séchage dans un courant d'air à température ambiante suffit), la solution est pulvérisée (avec beaucoup de soin) uniformément sur la surface de la couche mince; la plaque portant la couche mince humide est disposée dans la cellule d'électrophorèse (A de la Fig. 2 de réf. 6); la connexion électrique entre la couche mince et les solutions d'électrolytes (800 ml) contenues dans les bacs à électrode est obtenue à l'aide de deux languettes (20 × 6 cm) de papier Whatman No. 2; après 15 min d'équilibre, la tension est appliquée aux bornes de la cellule d'électrophorèse. Les intensités et les tensions indiquées dans les légendes des figures correspondent aux valeurs initiales.

Matériel employé

Les plaques de verre portant les couches minces ont les dimensions 200 × 200 (ou 400) × 4 mm; dans tous les exemples de séparation électrophorétique présentés, l'épaisseur des plaques de verre sera toujours indiquée; en effet, ce facteur est important dans le cas où les plaques de verre ne sont pas refroidies et spécialement lorsque le temps d'électrophorèse est relativement court. En effet, en électrophorèse de zone

* 10 gouttes = 0.197 g d'alcool.

lorsque l'on ne dissipe pas rapidement l'énergie produite par effet Joule, on sait que les résultats obtenus (taille et position des taches de substance) dépendent d'un grand nombre de facteurs liés à l'importance de l'évaporation de la solution d'électrolyte contenue dans la couche mince^{9,10}. La plaque de verre relativement épaisse joue ici le rôle de capacité calorifique et le résultat obtenu, toutes les autres conditions restant les mêmes, peut différer légèrement selon l'épaisseur de la plaque de verre.

L'étaleur utilisé est celui mis au point par STAHL⁴ et manufacturé par Desaga (Roucaire, Paris).

Cuves à chromatographie. Les couches minces de poudre de cellulose sans liant utilisées sont suffisamment adhérentes à la plaque de verre pour que tous les chromatogrammes puissent être développés en "couche mince plafond"⁶ dans une cuve dérivant du principe de celle de BRENNER ET NIEDERWIESER⁷ et selon le modèle que nous avons décrit⁶.

Suivant les cas, les chromatogrammes sont développés soit en simple irrigation (voir schéma A de la Fig. 3 de réf. 6), soit en atmosphère conditionnée selon le procédé dit de double irrigation (voir le schéma C de la Fig. 3 de réf. 6). Dans ce dernier cas, le mélange à analyser étant déposé près de l'origine sur la "couche mince-plafond", la cuve est montée⁶ puis on commence l'irrigation, par le solvant devant créer l'atmosphère de la cuve; lorsque le front du 1-er solvant a atteint l'extrémité de la plaque (languette I₃ de la Fig. 3C de réf. 6) le développement du chromatogramme proprement dit (couche mince déposée sur la face inférieure de la plaque supérieure de la cuve) est commencé. Dans les conditions opératoires donnant de bons résultats, le développement par le solvant "toluène" modifié (voir page 352) était réalisé en double irrigation, la couche mince portée par la face supérieure de la plaque de verre inférieure étant préalablement irriguée par de l'ammoniaque 0.8 N. Les développements par le solvant isobutanol-acide acétique glacial-eau (100:4:20) étaient réalisés en simple irrigation avec écoulement continu du solvant (remplacement de la baguette de fermeture de la cuve (b de la Fig. 3A de réf. 6) par un accordéon de papier (dispositif A de la Fig. 4 de réf. 6)).

Cellule d'électrophorèse. Les électrophorèses sur couche mince sont réalisées à l'aide d'une cellule (A de la Fig. 2 de réf. 6, pour plaques 200 × 200 × 4 mm) déjà décrite. Les conditions opératoires choisies permettent d'utiliser les avantages de l'électrorhéophorèse^{9,10}: taches petites et bien délimitées (voir Fig. 7) restant dans le champ d'expérience malgré l'emploi d'un gradient de potentiel non négligeable.

Enregistrement photographique des chromatogrammes

Les taches de DNP aminoacides sont mises en évidence sur les chromatogrammes grâce à leur capacité d'absorber un rayonnement filtré à 360-366 m μ (lampe Mazda MAV, 75 W à filtre de Wood) par une modification du procédé utilisé en chromatographie sur papier¹: enregistrement photographique de l'absorption d'un rayonnement filtré (pour les conditions opératoires voir réfs. 3 et 8). Ici, un papier sensible ("Lumière" R 6/5 pour reproduction de documents, mince, lisse, simple face, ultra contraste) était glissé sous la plaque de verre portant la couche mince. Cette dernière étant en contact direct avec la surface sensible, l'ensemble était éclairé à travers la lame de verre. Après développement photographique de la surface sensible, on obtenait les enregistrements présentés dans les Figs. 1, 3, 5 et 7.

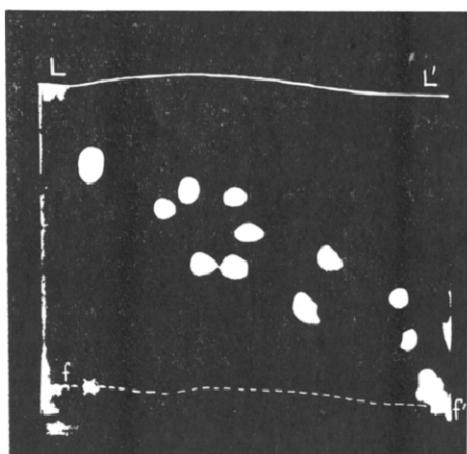


Fig. 1. Enregistrement photographique d'un chromatogramme à deux dimensions sur couche mince (250μ) de poudre de cellulose des DNP-aminoacides naturels éthéro-solubles les plus fréquemment rencontrés; plaques $200 \times 200 \times 4$ mm. X = position de dépôt du mélange des DNP-aminoacides; 3 à 7 μ moles de chaque DNP-aminoacide; développement, en 1-ère dimension (1 h 15): phase organique décantée du mélange toluène-monochlorhydrine du glycol-pyridine-ammoniaque 0.8 N (150:90:45:90) et 10 à 12 gouttes (voir texte) d'alcool octylique primaire, après équilibration (1 h 15) de l'atmosphère de la cuve (voir texte) avec l'ammoniaque 0.8 N; en 2-ème dimension (1 h): eau saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -eau-dodécylsulfate de sodium (100 ml:700 ml:0.576 g); précautions à prendre pour obtenir cette parfaite définition des taches; voir le texte; "auto-cuve" montée en "double irrigation" pour le développement en 1-ère dimension (comme indiqué dans la Fig. 3 C de réf. 6), en "simple irrigation" pour le développement en 2-ème dimension (comme indiqué dans la Fig. 3 A de réf. 6); pour la désignation des substances voir la Fig. 2.

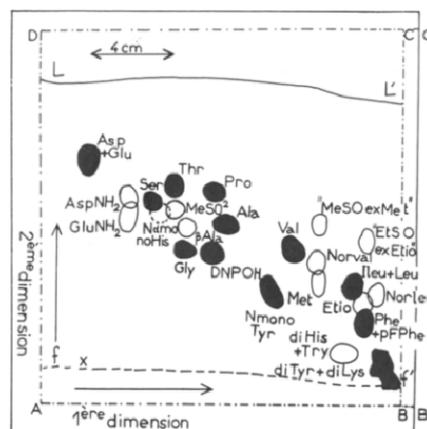


Fig. 2. Schéma montrant les positions des DNP-aminoacides éthéro-solubles après chromatographie à deux dimensions sur couche mince (250μ) de poudre de cellulose; plaques $200 \times 200 \times 4$ mm. Front du solvant, après développement en 1-ère dimension, confondu avec le bord droit de la plaque; après développement en 2-ème dimension; front du solvant en LL'—; les taches noires, correspondant aux DNP-aminoacides naturels les plus fréquemment rencontrés, sont celles des DNP-aminoacides présents sur le chromatogramme dont l'enregistrement photographique est donné dans la Fig. 1; les taches marquées par un simple trait indiquent les positions d'autres DNP-aminoacides; ——— = limites (20×20 cm) de la plaque de verre; - - - - - = limites de la couche mince de poudre de cellulose; la partie BB'C'C de la couche mince est éliminée avant développement en 2-ème dimension; les autres conditions de chromatographie sont indiquées dans la légende de la Fig. 1.

Précautions à prendre lors des chromatographies et électrophorèses

Pendant tout le temps des chromatographies et électrophorèses les taches des DNP-aminoacides sont protégées de l'action destructrice de la lumière. Ceci est facilement réalisé en emballant les cuves et les chromatogrammes dans une mince feuille d'aluminium.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Cas des DNP-aminoacides éthéro-solubles

Lorsque nous avons tenté d'employer le système solvant [1-ère dimension: chromatographie de partage avec le solvant "toluène"¹; 2-ème dimension: chromatographie de relargage avec une solution aqueuse de phosphate²] et les conditions opératoires qui donnent d'excellents résultats en chromatographie sur papier^{1,2,12}, pour la chromatographie en couche mince de poudre de cellulose, nous n'avons obtenu qu'un médiocre résultat: les 15 DNP-aminoacides éthéro-solubles appa-

raissent sous forme de 7 taches très diffuses et très allongées. C'est alors que nous avons entrepris une étude systématique de l'influence des conditions de chromatographie sur la netteté et la taille des taches de DNP-aminoacide et sur le degré de séparation obtenu.

En chromatographie sur papier des DNP-aminoacides, nous avons observé³ que les taches de substances étaient rondes et extrêmement petites, avec des bords très nets, si, avant développement par le solvant "toluène", la feuille de papier portant la tache du mélange des DNP-aminoacides et l'atmosphère de la cuve à chromatographie, étaient équilibrées avec une grande quantité d'ammoniacque 0.8 N. Les taches étaient notablement diffuses si l'équilibre avait été obtenu avec la phase aqueuse décantée de la préparation du solvant "toluène" (ou avec le solvant lui-même) ou si l'ammoniac avait été éliminé de l'atmosphère de la cuve juste au moment du démarrage du développement du chromatogramme avec le solvant "toluène". En un mot, le contact des taches de DNP-aminoacides, avec une atmosphère très riche en ammoniac, *avant et pendant le développement* du chromatogramme par le solvant "toluène" est essentiel*. Nous avons retrouvé les mêmes résultats en chromatographie en couche mince de poudre de cellulose. Dans ce cas, pour pouvoir réaliser ce pré-équilibre de la tache du mélange des DNP-aminoacides et de l'atmosphère de la cuve à chromatographie avec l'ammoniac, nous avons imaginé une modification⁶ de la cuve de BRENNER ET NIEDERWIESER⁷. Cette modification⁶ permet, en particulier, de réaliser l'irrigation séparée de deux couches minces se faisant face dans une même cuve. La plaque de verre portant la couche mince supérieure [ayant reçu, près de l'origine, la tache du mélange à analyser] et la plaque de verre portant l'autre couche mince sont assemblées (voir cliché C de la Fig. 3 de réf. 6), puis on procède à l'irrigation de cette dernière par de l'ammoniacque 0.8 N. Après 1 à 2 h (plaques 200 × 200 mm) d'équilibre**, le développement de la couche mince supérieure par le solvant "toluène" est commencé.

Comme en chromatographie sur papier, si l'on veut maintenir la parfaite définition des taches de substance après chromatographie dans le solvant "toluène" en atmosphère ammoniacale, il faut réaliser un séchage *rapide* du chromatogramme (violent courant d'air au voisinage de l'ouverture d'une hotte presque totalement fermée). Dans le cas d'une couche mince de poudre de cellulose, au cours d'un séchage à l'étuve (80°) ou d'un séchage à température ambiante en l'absence de courant d'air violent, les taches de DNP-aminoacides deviennent rapidement très diffuses et le chromatogramme est inutilisable pour une chromatographie en deuxième dimension.

Ayant mis au point de bonnes conditions opératoires pour la chromatographie en couche mince de poudre de cellulose dans le solvant "toluène", nous avons essayé de développer les chromatogrammes en deuxième dimension avec le tampon phosphate (1.5 M, pH 6.0) habituel; la progression du solvant était en général curieuse-

* Le degré hygrométrique de l'atmosphère de la cuve joue aussi un grand rôle sur la définition des taches; comme exemple, indiquons que les taches de DNP-aminoacides sont très diffuses lorsque l'atmosphère de la cuve a été créée par une solution d'ammoniac dans le glycol.

** Le temps d'irrigation de la couche mince inférieure par le solvant "toluène", avant le développement de la couche supérieure par le solvant "toluène", a une *grosse influence sur les séparations*; des résultats satisfaisants sont obtenus pour un temps d'irrigation de 45 min à 2 h; les meilleurs résultats (taches très nettes, absence de déformation dans certaines zones du chromatogramme) sont obtenus pour 1 h d'irrigation; au delà de 2 h (temps exigé pour un déplacement de 18 cm du front de l'ammoniacque dans la couche mince) d'irrigation, les taches comprises entre la N-mono-DNP-tyrosine et le front du solvant "toluène" sont très déformées.

ment irrégulière; on pouvait voir sur le chromatogramme 11 taches diffuses plus ou moins allongées; les séparations obtenues étaient, d'un essai à l'autre, totalement irreproductibles; nous avons alors supposé que ces irrégularités de progression du tampon étaient dues à une rétention excessive des constituants du solvant de 1-ère dimension et que ceux-ci avaient partiellement lipophilisé les fibres de cellulose de la couche mince. Nous avons alors imaginé d'ajouter au tampon phosphate (0.75 M, pH 6.0) une petite quantité (1 %) d'agent tensio-actif (Tween 20: polyoxyéthylène sorbitane monolaurate); ceci nous a permis d'obtenir des taches rondes et petites pour les DNP-aminoacides de faible mobilité dans le solvant "toluène" (c'est à dire jusqu'à la tache du mélange DNP-alanine + DNP-OH + DNP-proline); les taches des DNP-aminoacides plus mobiles (dans le solvant "toluène") étaient déformées, comme entraînées par un second front liquide lors de la chromatographie en 2-ème dimension; l'augmentation (jusqu'à 4 %) ou la diminution (jusqu'à 0.5 %) de la concentration en Tween 20 dans le tampon phosphate n'améliorait pas les résultats obtenus d'une manière intéressante; il en était de même lorsqu'on substituait le Tween 80 (polyoxyéthylène sorbitane monooléate) au Tween 20.

Nous avons alors remarqué, sur le chromatogramme développé en deux dimensions, que la limite séparant le domaine où les taches étaient rondes et nettes et le domaine où elles étaient mêlées et déformées correspondait assez étroitement avec l'une (limite $\beta\beta'$, voir sa position par exemple, dans le schéma de la Fig. 4) des limites

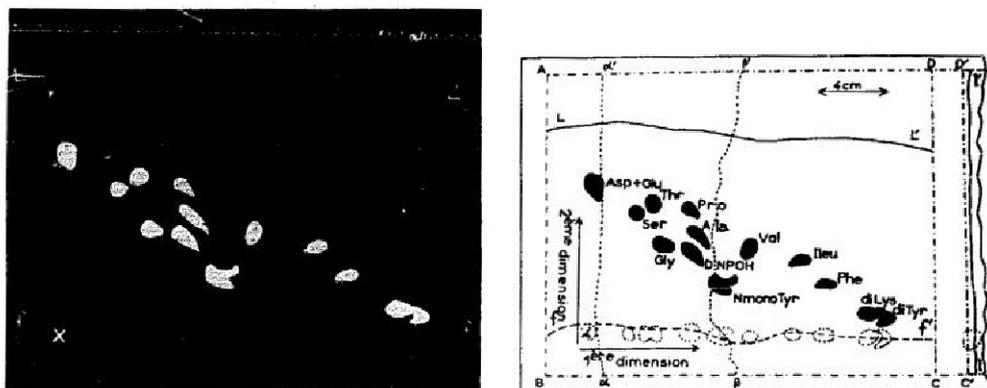


Fig. 3. Enregistrement photographique d'un chromatogramme à deux dimensions sur couche mince (250μ) de poudre de cellulose des DNP-aminoacides naturels éthero-solubles les plus fréquemment rencontrés; plaque $200 \times 400 \times 4$ mm. X = position de dépôt du mélange des DNP-aminoacides; 3 à 7 μ moles de chaque DNP-aminoacide; développement en 1-ère et 2-ème direction, respectivement, selon la plus grande et la plus petite dimension de la plaque; les conditions de chromatographie sont les mêmes que celles données dans les Figs. 1 et 2, excepté que le front du solvant de 1-ère dimension s'est déplacé de 25 cm, que le temps d'équilibre du chromatogramme avec l'ammoniaque 0.8 N, et le temps de développement en 1-ère dimension, sont, ici, respectivement de 1 h 30 et 1 h 30; LL' = front du solvant après développement en 2-ème dimension (1 h); pour la désignation des substances voir Fig. 4.

Fig. 4. Schéma montrant les positions des DNP-aminoacides éthero-solubles après chromatographie à deux dimensions sur couche mince (250μ) de poudre de cellulose; plaques $200 \times 400 \times 4$ mm. Conditions de chromatographie données dans la légende de la Fig. 3; ll' = position atteinte par le front du solvant de développement en 1-ère dimension; DD'C'C = portion de la couche mince éliminée avant le développement en 2-ème dimension; LL' = position atteinte par le front du solvant de développement en 2-ème direction; les taches délimitées par un pointillé et les taches noires représentent les positions des DNP-aminoacides après développement du chromatogramme respectivement, en 1-ère et 2-ème dimension.

des trois zones d'opalescence différente présentes en première dimension sur le chromatogramme développé par le solvant "toluène"; ces trois zones étaient respectivement comprises entre l'origine du chromatogramme et la limite $\alpha\alpha'$, la limite $\alpha\alpha'$ et la limite $\beta\beta'$, la limite $\beta\beta'$ et le front II' du solvant; ces limites sont données à titre indicatif dans le schéma de la Fig. 4. Ceci nous a fait penser qu'au moins deux de ces trois zones étaient dues à la "dissociation capillaire" des constituants du solvant "toluène" au cours de son cheminement chromatographique et qu'en particulier la zone la plus rapide avait considérablement "lipophilisé" les fibres de cellulose et que même en présence d'agents tensio-actifs (Tween 20, Tween 80), il n'était plus possible de réaliser une chromatographie de relargage dans cette partie du chromatogramme. Notons qu'indépendamment, nous avons été amené à cette même conclusion au cours d'études sur la cinétique de déformation des taches des DNP-aminoacides de grande mobilité dans le solvant "toluène" sur longues feuilles (75 cm) de papier. Pour essayer de réduire cette "dissociation capillaire" des constituants du solvant "toluène" nous avons ajouté à ce dernier un agent tensio-actif: l'alcool octylique primaire* (10 à 12 gouttes — voir techniques expérimentales — pour le solvant correspondant à 150 ml de toluène). Dans ces conditions opératoires, il a été possible de réaliser en 2-ème dimension, une chromatographie de relargage (tampon phosphate 0.75 M, pH 6.0 à 0.5 % de Tween 20) donnant des taches nettes pour l'ensemble des DNP-aminoacides; cependant la reproductibilité, d'un chromatogramme à l'autre, de la netteté des taches n'était pas encore parfaite. Le remplacement du Tween 20 par le dodécyl sulfate de sodium** (concentration finale 0.0025 M) dans le tampon phosphate (0.75 M, pH 6.0) utilisé pour le développement en 2-ème dimension allait permettre d'obtenir des chromatogrammes extrêmement reproductibles, dont toutes les taches de DNP-aminoacides étaient rondes, petites et très nettes (voir Figs. 1 et 2)***. La substitution au mélange des phosphates ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, NaPO_4H_2 ; 0.75 M en PO_4^{3-} , pH 6.0) d'autres sels (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaPO_4H_2 , NaCl) de concentration convenable, soit seuls soit en mélanges, permettent également d'obtenir de bons résultats (les compositions de ces solutions (a) à (i) sont données dans la partie expérimentale) en présence de dodécylsulfate de sodium.

Conditions de chromatographie adoptées. Les conditions opératoires adoptées pour obtenir la séparation chromatographique en couche mince (250 μ) de poudre de cellulose sur plaque 200 \times 200 mm, de l'ensemble des DNP-aminoacides éthero-solubles sous forme de taches nettes et rondes sont données dans la partie expérimentale (voir page 349) et dans les légendes des Figs. 1 et 2. La Fig. 1 correspond à l'enregistrement photographique du chromatogramme obtenu pour les DNP-aminoacides les plus couramment rencontrés. On remarquera la grande définition des taches obtenues. Le schéma de la Fig. 2 montre les positions de l'ensemble des DNP-aminoacides éthero-solubles; les taches noires, sur ce même schéma, correspondent aux DNP-aminoacides du chromatogramme de la Fig. 1. Comme en chromatographie sur papier, les acides DNP-glutamique et DNP-aspartique restent mêlés;

* Ou l'alcool octylique normal secondaire, l'alcool laurique.

** Ou le Brij 35 (polyoxyéthylène lauryl ether): 0.75 g/l.

*** On doit noter qu'une prolongation excessive (voir note** pag e352) du temps d'irrigation de la couche mince inférieure par l'ammoniaque 0.8 N, avant le développement (par le solvant "toluène") du chromatogramme proprement dit, provoque une intensification des fronts intermédiaires (et spécialement du front $\beta\beta'$ (voir Fig. 4) qui peut occasionner une déformation des taches se trouvant à son niveau; voir un exemple dans la Fig. 4).

il en est de même pour la DNP-glutamine et la DNP-asparagine, pour la di-DNP-histidine et le DNP-tryptophane. Contrairement aux résultats obtenus en chromatographie sur papier, en chromatographie sur couche mince, les taches de DNP-thréonine, DNP-sérine, DNP-méthionine sulfone sont très bien séparées les unes des autres; ceci est très important, puisqu'on sait que ce dérivé de la méthionine est la forme stable de cet aminoacide au cours de l'hydrolyse chlorhydrique des protéines¹¹. Dans le schéma de la Fig. 2, la position d'un DNP-aminoacide hydro-acido-soluble l' α -mono-DNP-histidine est indiquée; en effet, dans certaines conditions d'extraction des DNP-aminoacides éthéro-solubles, un peu de di-DNP-histidine peut être entraînée dans ce groupe; ce DNP-aminoacide peu stable a tendance à donner de l' α -mono-DNP-histidine; il était donc intéressant d'indiquer la position de ce dernier dans les chromatogrammes à deux dimensions, d'autant plus qu'elle est très voisine de celle de la DNP-sérine.

On remarquera sur les Figs. 1 et 2 que la tache de di-DNP-tyrosine et celle de la di-DNP-lysine sont, quelquefois, confondues lorsque le chromatogramme est réalisé sur couche mince de 200 \times 200 mm. Ceci tient au fait que ces deux DNP-aminoacides se trouvent près du front du solvant c'est à dire en un point où les impuretés les plus liposolubles contenues dans la couche mince s'accumulent et réduisent le pouvoir séparateur de la chromatographie. Ceci nous engage à conseiller de réaliser la chromatographie sur plaque 200 \times 400 mm. Dans ce cas les taches des deux di-DNP-aminoacides précédents ne sont plus confondues avec le front du solvant "toluène" [qui se déplace d'environ 25 cm (ll' Fig. 4)]; les conditions opératoires sont indiquées dans la partie expérimentale page 349, et dans les légendes des Figs. 3 et 4. Le solvant "toluène" additionné d'alcool octylique, permet de développer le chromatogramme en 1-ère direction en atmosphère ammoniacale, dans la plus grande dimension (400 mm) de la plaque tandis que la chromatographie de relargage dans une solution aqueuse de sulfate d'ammonium contenant du dodécyl sulfate de sodium est réalisée parallèlement à la plus petite dimension de la plaque. Dans ces conditions, on obtient, aussi, une bonne séparation des taches de la di-DNP-tyrosine et de la di-DNP-lysine*. La séparation entre ces deux taches, après chromatographie en 1-ère dimension est déjà excellente mais elle est due à une chromatographie de partage avec déplacement (la tache de di-DNP-lysine "chasse" la tache de di-DNP-tyrosine). On peut conseiller de récupérer la partie de la couche mince portant ces deux taches avant de développer le chromatogramme par chromatographie de relargage en 2-ème dimension.

Dans les conditions de chromatographie définitivement adoptées (Figs. 1, 2, 3 et 4) on voit que l'on a préféré une solution de sulfate d'ammonium au tampon phosphate habituel pour développer les chromatogrammes en 2-ème direction. En effet, les taches des DNP-aminoacides de grande mobilité (dans le solvant "toluène") sont plus parfaites après chromatographie de relargage dans la première solution saline que dans la seconde.

* Au cours de la chromatographie dans la solution de sulfate d'ammonium contenant du dodécylsulfate de sodium (0.0025 M), on voit un front lent (marqué ff' dans la Fig. 4) qui a tendance à mêler les taches de di-DNP-Tyr et de di-DNP-Lys, lorsqu'il atteint leur niveau; ce phénomène perturbateur est évité en utilisant une concentration plus faible (0.001 M) de dodécylsulfate ou en utilisant un détergent neutre (Brij 35).

Cas des DNP-aminoacides éthero-solubles de faible mobilité dans le solvant "toluène"

Pour obtenir la séparation sur couche mince des DNP-aminoacides des mélanges non résolus (acide DNP aspartique + acide DNP glutamique + DNP-S-carboxyméthyl-cystéine, DNP-glutamine + DNP-asparagine) après chromatographie dans le système "toluène"-sulfate d'ammonium", nous avons essayé de transposer le procédé que nous avons décrit³ pour la chromatographie sur papier. Après développement en 1-ère dimension, en atmosphère ammoniacale, dans le solvant "toluène" additionné d'alcool octylique primaire (mêmes conditions opératoires que celles décrites dans le paragraphe précédent), la couche mince est imprégnée d'acétate de sodium (voir partie expérimentale et les légendes des Figs. 5 et 6) puis le développement, en 2-ème dimension, est réalisé avec un mélange d'alcool et d'acide juste saturé d'eau [isobutanol-acide acétique-eau (100:4:20)].

Sur les clichés des Figs. 5 et 6 on peut voir que la séparation sur couche mince des taches de la S-carboxyméthyl-cystéine, de son produit d'oxydation à l'air, des acides DNP aspartique et DNP glutamique, de la DNP-glutamine et de la DNP-asparagine, de la DNP-sérine, de la DNP-thréonine, du DNP-glycocolle, est aussi parfaite qu'en chromatographie sur papier³; les séparations sont extrêmement nettes et les taches de DNP-aminoacides sont très petites. Pour obtenir ces résultats en

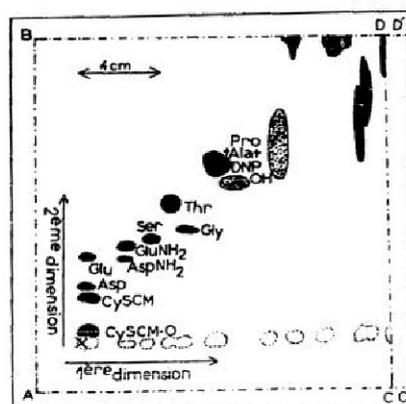
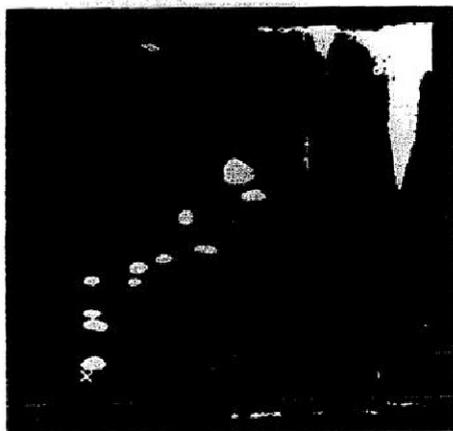


Fig. 5. Enregistrement photographique d'un chromatogramme à deux dimensions sur couche mince (250μ) de poudre de cellulose des DNP-aminoacides éthero-solubles de faible mobilité dans le solvant "toluène"; plaque $200 \times 200 \times 4$ mm. X = position de dépôt du mélange des DNP-aminoacides; 3 à 7 μ moles de chaque DNP-aminoacide; développement en 1-ère dimension (2 h 30) avec le solvant "toluène" dans les conditions de chromatographie identiques à celles utilisées pour les chromatogrammes des Figs. 1 et 2; développement (6 h) en 2-ème dimension par le solvant isobutanol-acide acétique glacial-eau (100:6:20) avec écoulement continu (dispositif A de la Fig. 4 de réf. 6), après imprégnation de la couche mince avec de l'acétate de sodium (pulvérisation, puis séchage rapide à 90° , d'une solution 0.2 M dans le mélange alcool-eau (6:4)); pour la désignation des substances voir Fig. 6.

Fig. 6. Schéma montrant les positions des DNP-aminoacides éthero-solubles de faible mobilité dans le solvant "toluène" (DNP-S-carboxyméthyl-cystéine, acide DNP aspartique, acide DNP glutamique, DNP-asparagine, DNP-glutamine, DNP-sérine, DNP-glycocolle, DNP-thréonine) après chromatographie à deux dimensions. Pour les solvants utilisés et les conditions de chromatographie: voir légende de la Fig. 5; les taches délimitées par un pointillé et les taches noires représentent les positions des DNP-aminoacides après développement du chromatogramme, respectivement, en 1-ère et 2-ème dimension; la partie DD'CC' de la couche mince est éliminée avant le développement en 2-ème dimension.

chromatographie en couche mince de poudre de cellulose, deux précautions doivent être prises: imprégnation de la couche mince par une solution *hydro-alcoolique* d'acétate de sodium afin d'éviter le décollement de la couche mince, séchage *rapide* (dans une étuve à 90°) de la couche humide pour que les taches des DNP-aminoacides restent petites. L'utilisateur du procédé ne s'étonnera pas d'observer que, quelquefois, certaines taches de DNP-aminoacides deviennent allongées dans les premiers moments du développement chromatographique en 2-ème dimension; après un certain temps, la substance contenue dans la queue de la tache est ramenée par le flux de solvant dans la masse de la tache et ainsi cette dernière devient parfaitement nette.

Cas des DNP-aminoacides hydro-acido-solubles

Il était essentiel de mettre au point un procédé pour séparer les DNP-aminoacides restant dans la phase aqueuse acide (HCl) après extraction des DNP aminoacides éthéro-solubles.

On sait qu'après chromatographie dans les solvants alcalins^{1,12,15*} les taches d' α -mono-DNP-arginine et d' ϵ -mono-DNP-lysine sont confondues et que seule une électrophorèse en milieu fortement alcalin (ammoniaque¹², diéthylamine³, triéthylamine³) permet d'obtenir la séparation de ces deux DNP-aminoacides. Le couplage d'une chromatographie dans le solvant "toluène" et d'une électrophorèse dans la diéthylamine 0.025 M nous a permis d'obtenir un excellent procédé de séparation sur feuille de papier de l'ensemble des DNP-aminoacides hydro-acido-solubles (acide DNP cystéique, di-DNP-histidine, α -mono-DNP-histidine, ϵ -mono-DNP-lysine, α -mono-DNP-arginine)³.

Ayant pu mettre au point des conditions opératoires qui permettent d'obtenir la séparation des DNP-aminoacides éthéro-solubles sur couche mince de poudre de cellulose et qui peuvent également s'appliquer à la séparation des DNP-aminoacides hydro-acido-solubles dans le solvant "toluène" additionné d'alcool octylique primaire, nous avons essayé d'obtenir la séparation complète par chromato-électrophorèse de ces derniers DNP-aminoacides.

Les clichés de la Figs. 7 et 8 montrent que les résultats obtenus sont aussi nets en chromatographie en couche mince de poudre de cellulose qu'en chromatographie sur papier. Pour obtenir des taches petites sur couche mince (250 μ) de poudre de cellulose déposée sur plaque 200 \times 200 \times 4 mm, il faut ajouter à la diéthylamine (ici 0.033 M) une concentration convenable d'un sel neutre (0.02 M NaCl par exemple) afin de rendre l'électrolyte suffisamment conducteur; ainsi, les taches sont plus nettes qu'en électrophorèse sans évaporation. Les séparations ont été réalisées dans l'appareil extrêmement simple (A de la Fig. 2 de réf. 6), déjà décrit, pour l'électrophorèse en couche mince de poudre de cellulose. Les conditions opératoires permettant d'obtenir ce résultat, sont indiquées dans les légendes des Figs. 7 et 8.

Si la di-DNP-histidine est présente dans le mélange à analyser, il faut prendre des précautions pour éliminer le solvant "toluène" ayant servi au développement en 1-ère dimension. En effet ce DNP-aminoacide est assez sensible à l'action de la lumière et des milieux alcalins. Si le chromatogramme était séché à 80°, une tache d' α -mono-DNP-histidine, dont le pourtour est indiqué par un trait interrompu (h) sur le schéma de la Fig. 8, apparaîtrait après l'électrophorèse en 2-ème dimension. La position (p)

* Solvant "toluène"^{1,12}, *n*-propanol-ammoniacque à 34 % (7:3)¹⁵, *n*-butanol-ammoniacque à 34 % (4:1)¹⁵.

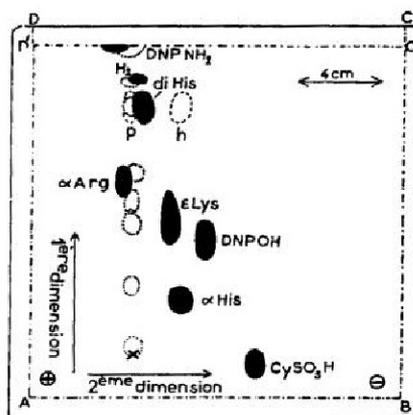
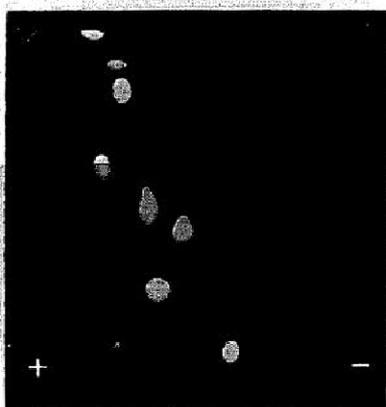


Fig. 7. Enregistrement photographique d'un chromatogramme à deux dimensions sur couche mince (250μ) de poudre de cellulose des DNP-aminoacides naturels hydro-acido-solubles: plaques $200 \times 200 \times 4$ mm. X = position de dépôt des substances à 6 cm du futur côté — pôle négatif; 3 à 7 μ moles de chaque DNP-aminoacide; développement chromatographique en première dimension (1 h 45 à 2 h 15) avec le solvant "toluène" en atmosphère ammoniacale (auto-cuve montée en "double irrigation" comme indiqué dans la Fig. 3 C de réf. 6) dans les conditions opératoires utilisées pour le développement en 1-ère dimension du chromatogramme de la Fig. 1; électrophorèse, en 2-ème dimension (9.5 mA, 385 V, 30 min, cuve d'électrophorèse A de la Fig. 2 de réf. 6; générateur de tension continue décrit dans la réf. 6) après pulvérisation d'une solution aqueuse de diéthylamine 0.033 M et de NaCl 0.02 M; précautions à prendre pour le séchage, après le développement en 1-ère dimension: voir le texte; pour la désignation des substances: voir Fig. 8.

Fig. 8. Schéma montrant les positions des DNP-aminoacides hydroacido-solubles (acide DNP cystéique, α -mono-DNP-histidine, ϵ -mono-DNP-lysine, α -mono-DNP-arginine, di-DNP-histidine) après chromatogramme-électrophorèse sur couche mince (250μ) de poudre de cellulose; plaque $200 \times 200 \times 4$ mm; 1-ère dimension: solvant "toluène" en atmosphère ammoniacale; 2-ème dimension: électrophorèse dans la diéthylamine; pour le solvant, la solution d'électrolyte et les conditions de chromatographie et d'électrophorèse utilisés, voir la légende de la Fig. 7; front du solvant, en fin de développement du chromatogramme en première dimension, confondu avec le bord (DC) de la couche mince; X = position de dépôt des substances; DD'C'C = portion de la couche mince éliminée avant l'électrophorèse en 2-ème dimension; les taches délimitées par un pointillé et les taches noires représentent les positions des DNP-aminoacides après développement du chromatogramme, respectivement, en 1-ère et 2-ème dimension; les taches délimitées par un trait interrompu (---) correspondent aux positions occupées par divers artefacts possibles (voir le texte) après développement du chromatogramme en 2-ème dimension; p = tache du produit de décomposition photochimique de la di-DNP-histidine (voir le texte), h = tache d' α -mono-DNP-histidine produite au cours d'un chauffage éventuel de la tache de di-DNP-histidine lors de l'élimination du solvant de chromatographie utilisé en 1-ère dimension.

du produit de décomposition photochimique de la di-DNP-histidine est également indiquée sur ce schéma (voir légende de la Fig. 8). La décomposition de la di-DNP-histidine en α -mono-DNP-histidine au cours de l'élimination du solvant "toluène" est fortement réduite si cette élimination a lieu à la température ambiante à l'aide d'un violent courant d'air (même méthode que pour l'élimination du solvant "toluène" dans le cas des DNP-aminoacides éthéro-solubles).

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Ainsi, nous venons de mettre au point des conditions opératoires qui permettent de séparer par chromatographie à deux dimensions et par chromatogramme-électrophorèse en couche mince de poudre de cellulose tous les DNP-dérivés correspondants aux

aminoacides présents dans les protéines natives ou modifiées par voie chimique. Les diagrammes des positions des taches de DNP-aminoacides que nous avons obtenus (Figs. 1 à 8) sont identiques à ceux que l'on a en chromatographie sur papier^{2,3,12}. Il devient donc, maintenant, extrêmement aisé de comparer les résultats obtenus par la chromatographie sur papier et par la chromatographie en couche mince. Le procédé décrit bénéficie de tous les avantages de la chromatographie en couche mince: exigence d'une faible quantité de produit (3 à 7 m μ moles, au lieu de 10 à 200 de chaque DNP-aminoacide en chromatographie sur papier), rapidité d'obtention des résultats, possibilité de réaliser simultanément un grand nombre de chromatogrammes dans un faible espace de travail. Ainsi, par exemple, on peut rapidement déterminer, grâce à plusieurs chromatographies en couche mince réalisées simultanément, la nature d'une tache de DNP-aminoacide repérée sur un chromatogramme sur papier, en ne mettant en oeuvre qu'une petite portion de l'éluat de la tache. Associé à l'emploi de témoins internes notre procédé de chromatographie en couche mince peut être très utile pour l'identification des aminoacides présents dans un hydrolysats chimique ou enzymatique d'oligopeptides naturels ou modifiés par voie chimique.

La seule méthode de chromatographie en couche mince mise au point pour les DNP-aminoacides, avant celle que nous présentons aujourd'hui, se limitait à l'analyse des DNP-aminoacides éthéro-solubles. Cette méthode employait des couches minces de gel de silice partiellement désactivé^{5,15,16} et ses auteurs, après avoir utilisé le solvant "toluène" de BISERTE ET OSTEUX¹ pour développer la 1-ère dimension de leur chromatogramme* remarquaient¹⁵ qu'il leur était impossible d'obtenir une séparation satisfaisante des DNP-aminoacides par chromatographie de relargage (tampon phosphate) en seconde dimension.

Comme nous venons de le montrer, nous avons été en mesure de réaliser la chromatographie de relargage après une chromatographie dans le solvant "toluène". Ce résultat a été obtenu car nous avons pu mettre en évidence les causes des incidents propres à la chromatographie en couche mince; incidents qui tiennent surtout, d'une part, à la rétention excessive des constituants du mélange solvant utilisé dans le développement des chromatogrammes, d'autre part, à un phénomène que nous avons désigné sous le nom de "dissociation capillaire" des constituants du mélange solvant. Ces incidents sont principalement dus à une lipophilisation des particules formant la couche mince par certains constituants du solvant mobile utilisé en 1-ère dimension. Dans une association chromatographie de partage direct, en 1-ère dimension, chromatographie de relargage en 2-ème dimension, nous avons pu montrer que tous les incidents de la chromatographie sont considérablement réduits si l'on utilise des concentrations convenables** d'agents tensio-actifs appropriés dans les solvants employés en 1-ère et 2-ème dimension.

Pour réaliser des chromatographies à deux dimensions des DNP-aminoacides éthéro-solubles sur couche mince de gel de silice, après chromatographie dans le solvant "toluène" selon leur mode opératoire, BRENNER, NIEDERWIESER ET PATAKI ont dû s'adresser à la chromatographie d'adsorption⁵ pour pouvoir développer le

* Sans employer un développement en atmosphère fortement ammoniacale mais tout au plus en prééquilibrant la plaque de gel de silice, pour la désactiver, avec les vapeurs de la phase aqueuse décantée du solvant "toluène"⁵.

** Un excès d'agent tensio-actif empêche, dans certains cas, toute séparation chromatographique.

chromatogramme en seconde dimension. Ces auteurs obtiennent des séparations assez satisfaisantes des DNP-aminoacides éthero-solubles quoiqu'il semble que la définition des taches soit moins bonne* que celle obtenue par le procédé que nous venons de mettre au point. Peut-être serait-il intéressant de reprendre l'étude de la chromatographie sur couche mince de gel de silice désactivée, en tenant compte des observations que nous avons faites en chromatographie sur couche mince de poudre de cellulose. Cependant, nous pensons que l'emploi de couches minces de poudre de cellulose est préférable à celui de couches de gel de silice car les premières n'exigent pas de liant et sont mécaniquement plus résistantes que les secondes et donc plus faciles à manipuler.

Quoiqu'il en soit, les diagrammes donnant les positions des taches des DNP-aminoacides après chromatographie selon le procédé de BRENNER, NIEDERWIESER ET PATAKI⁵ ne peuvent pas être comparés avec le diagramme obtenu en chromatographie sur papier avec le système "toluène"- "phosphate"^{2,12}.

Dans nos conditions opératoires, quoique nous ayons utilisé un système "toluène"- "sulfate d'ammonium" sur couche mince de poudre de cellulose, le diagramme des positions des taches des DNP-aminoacides éthero-solubles est identique à celui obtenu en chromatographie sur papier avec le système "toluène"- "phosphate".

Enfin, on doit aussi faire remarquer, que dans notre procédé, l'extrême définition des taches de DNP-aminoacides après chromatographie tient au fait que nous avons pu montrer que les DNP-aminoacides doivent être maintenus sous forme de sels d'ammonium au cours de la chromatographie dans le solvant "toluène"; ceci exige une très forte concentration en ammoniac dans l'atmosphère des cuves. Nous avons déjà pressenti cette exigence³ en chromatographie sur papier mais, dans ce cas, elle n'était pas absolue. Il n'en est pas de même en chromatographie en couche mince de poudre de cellulose où une trop faible concentration en ammoniac dans l'atmosphère des cuves donne naissance à des taches diffuses de DNP-aminoacides.

RÉSUMÉ

Des méthodes efficaces de séparation chromatographique des DNP-aminoacides sur couche mince (250 μ) de poudre de cellulose sans liant sont décrites. Dans les conditions opératoires utilisées, il est possible de séparer, sous forme de taches extrêmement bien définies tous les DNP-aminoacides du groupe des éthero-solubles et des hydro-acido-solubles. Sur plaque 20 \times 20 (ou 30) cm, la quantité optimum de chaque DNP-aminoacide pouvant être mise en oeuvre est de 3 à 7 m μ moles.

SUMMARY

Some efficient methods of chromatographic separation of DNP-amino acids on thin layers (250 μ) of powdered cellulose without binder are described. Under the operating conditions used, it is possible to separate all the DNP-amino acids of the ether-soluble and hydracid-soluble groups in the form of well defined spots. The optimum quantity of each DNP-amino acid which can be applied to a plate 20 \times 20 (or 30) cm is 3-7 m μ moles.

* Voir les photographies des chromatogrammes de BRENNER et coll.¹⁶. (Note by editor: This comparison is not quite just, as the latter are urine samples and not synthetic mixtures.)

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 50.
- 2 A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.
- 3 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *Bull. Soc. Chim. France*, (1963) 2939.
- 4 E. STAHL, *Thin layer chromatography*, Academic Press, New York, 1965, p. 6.
- 5 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER ET G. PATAKI, *Experientia*, 17 (1961) 145.
- 6 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *J. Chromatog.*, 22 (1966) 336.
- 7 M. BRENNER ET A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 17 (1961) 237.
- 8 R. MUNIER, dans L. LOISELEUR (Rédacteur), *Techniques de Laboratoire: Chimie Biologique, Chimie Physique*, Tome I, Fasc. 1, Masson, Paris, 1963, p. 636.
- 9 M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE ET J. M. DUBERT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35 (1953) 334 et 346; *Chem. Weekblad*, 49 (1953) 237.
- 10 R. L. MUNIER, *Chim. Anal. (Paris)*, 36 (1954) 253, 283 et 340.
- 11 N. P. NEUMANN, S. MOORE ET W. H. STEIN, *Biochemistry*, 1 (1962) 68.
- 12 G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE ET P. SAUTIÈRE, dans M. LEDERER (Rédacteur), *Chromatographic Reviews*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1960, p. 59.
- 13 R. L. MUNIER, *Journées Internationales de Séparation Immédiate et de Chromatographie, Paris, 13, 14, 15 juin, 1961*, Gams, Paris, 1961, p. 189-192.
- 14 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *Compt. Rend.*, 256 (1963) 3532.
- 15 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER ET G. PATAKI, dans E. STAHL (Rédacteur), *Thin Layer Chromatography*, Academic Press, New York, 1965, p. 418-419.
- 16 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER ET G. PATAKI, dans A. T. JAMES ET J. L. MORRIS (Rédacteurs), *New Biochemical Separations*, Van Nostrand Co., New York, 1964, pp. 123-156.

J. Chromatog., 22 (1966) 347-361