

## SÉPARATION ET DOSAGE D'ACIDES AMINÉS EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

R. BONDIVENNE ET N. BUSCH

*Département Chimie Organique, Centre Européen de Recherches Mauvernay, Riom (France)*

(Reçu le 13 décembre 1966)

Pendant de longues années, depuis la mise au point par CONSDEN, GORDON ET MARTIN<sup>1</sup> de la chromatographie sur papier, cette technique resta la méthode par excellence pour la séparation et la détermination des acides aminés dans un mélange quel qu'il soit.

Malgré les nouvelles possibilités qu'offrait cette méthode, les inconvénients présentés, en particulier sa lenteur d'application, devaient pousser les chercheurs à tenter de l'améliorer.

Bien que le principe de la chromatographie sur couches minces (C.C.M.) ait été décrit depuis plus d'un quart de siècle par ISMAILOV ET SHRAIBER<sup>2</sup> il ne fut utilisé que plus tard et presque exclusivement pour la séparation de terpènes<sup>3,4</sup>. Il a fallu attendre que STAHL standardise à la fois les procédés d'application et un appareillage pratique et ingénieux pour que l'on s'en serve couramment<sup>5-9</sup>.

Le but de notre travail a été d'appliquer la chromatographie en couches minces à la séparation d'acides aminés, puis au dosage de certains d'entre eux en employant, d'une part, des solutions synthétiques, et, d'autre part, un extrait de muscle cardiaque animal.

### SÉPARATION QUALITATIVE

Depuis 1959 différentes recherches furent accomplies pour séparer les acides aminés par la chromatographie sur couches minces. Les techniques employées utilisent quantités de solvants et de substrats: Le gel de silice, accompagné ou non de liant fut souvent employé pour l'étude de ces séparations et pour la mise au point de différentes méthodes, en particulier celle dite "à front perdu"<sup>1,10-16</sup>. L'utilisation de l'oxide d'aluminium amena, dans des applications particulières, des résultats satisfaisants<sup>17-19</sup>. Signalons aussi les tentatives faites sur Kieselguhr, Celite, Sephadex, sulfate de baryum<sup>20-23</sup>. Concurrément à ces recherches de nombreuses équipes essayèrent la cellulose: nouveaux systèmes de solvants et nouvelles techniques mono- ou bi-dimensionnelles virent le jour<sup>24-31</sup>. Enfin BUJARD en 1964 décrit un nouveau couplage de solvant<sup>20,24,29</sup>.

Il nous a paru hors de propos de signaler tous les travaux relatifs à la séparation des dérivés des acides aminés. La méthode ici exposée n'est pas d'une grande originalité et n'est que l'amélioration de celles ci-dessus citées, mais nous pensons que telle, elle pourra rendre des services.

#### *Préparation des plaques*

Nous avons d'abord employé la Cellulose 300 MN de Macherey et Nagel avec les quantités préconisées par le fabricant, mais du fait des difficultés de prise de

cette cellulose sur le verre, nous avons été amenés à préciser un mode opératoire.

Les plaques sont mises à tremper pendant 24 h dans la potasse alcoolique, puis après un rinçage d'environ 2 h à l'eau courante au moyen d'un système de siphon, elles sont soigneusement essuyées au papier filtre en évitant d'y laisser toute trace de doigts. D'un autre côté, on prépare un empois avec 200 mg d'amidon de maïs dans 90 ml d'eau distillée. On laisse refroidir environ 5 min et on incorpore 15 g de Cellulose 300 MN. Cette suspension devant être énergiquement agitée, on a constaté que les résultats les meilleurs étaient obtenus en malaxant avec un mixer pendant 3 fois 30 sec, avec 30 sec d'arrêt entre chaque agitation. Cette bouillie est ensuite étalée sur les plaques de verre au moyen de l'appareil mis au point par STAHL. Cet étaleur est réglé à 0.5 mm d'épaisseur de telle manière que, après séchage, la couche soit de l'ordre de 0.3 à 0.4 mm. Ces plaques sont préparées le soir et laissées à sécher toute la nuit à la température du laboratoire.

#### *Problème de la saturation des cuves*

Nos chromatographies devant être faites dans les cuves parallélépipédiques commercialisées par Desaga, il a paru bon de faire des essais de migration avec: (a) un degré de saturation normal; (b) un degré de saturation augmenté par la présence d'une feuille de papier Whatman No. 3, imbibée de solvant et appliquée sur trois des quatre parois de la cuve, d'après les conclusions de HONEGGER<sup>32</sup>.

Ces expériences ont montré la nécessité à la fois d'une saturation préliminaire de la cuve et d'une durée de temps d'équilibrage de la plaque avant migration. Nous avons donc conçu le dispositif donné par la Fig. 1. Grâce à cet appareillage, nous opérons ainsi: 120 à 130 ml du solvant employé sont placés au fond de la cuve. On applique une feuille de papier Whatman No. 3 sur trois de ses faces (une grande et deux petites) et on laisse le solvant imbiber seul cette feuille. Pendant cette opération, la cuve est inclinée, soutenue par b et calée par c et d (Fig. 1).

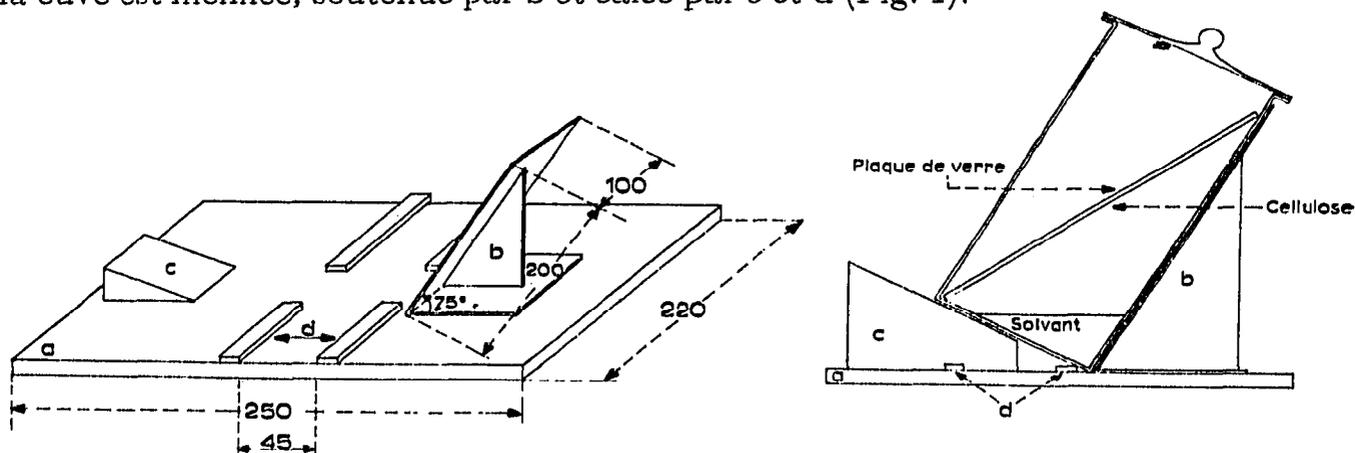


Fig. 1. Supports pour la saturation des cuves. a = Socle en bois; b = appui en polyvinyle; c = cale de bois mobile; d = bande caoutchouc mousse.

Fig. 2. Vue de profil de la cuve en position de saturation sur son support. Annotations, voir la Fig. 1.

Puis, la plaque étant prête, on l'introduit dans la cuve de telle manière que le bord inférieur ne soit pas atteint par le solvant et que la face recouverte de cellulose soit en dessous, donc dirigée vers la grande face de la cuve recouverte de papier

Whatman No. 3 (Fig. 2). On laisse la plaque s'équilibrer pendant une demi-heure en position inclinée et on démarre la migration en ôtant la cale *c* et en mettant la cuve en position verticale. La Fig. 3 montre deux cuves dans les deux positions ainsi décrites.

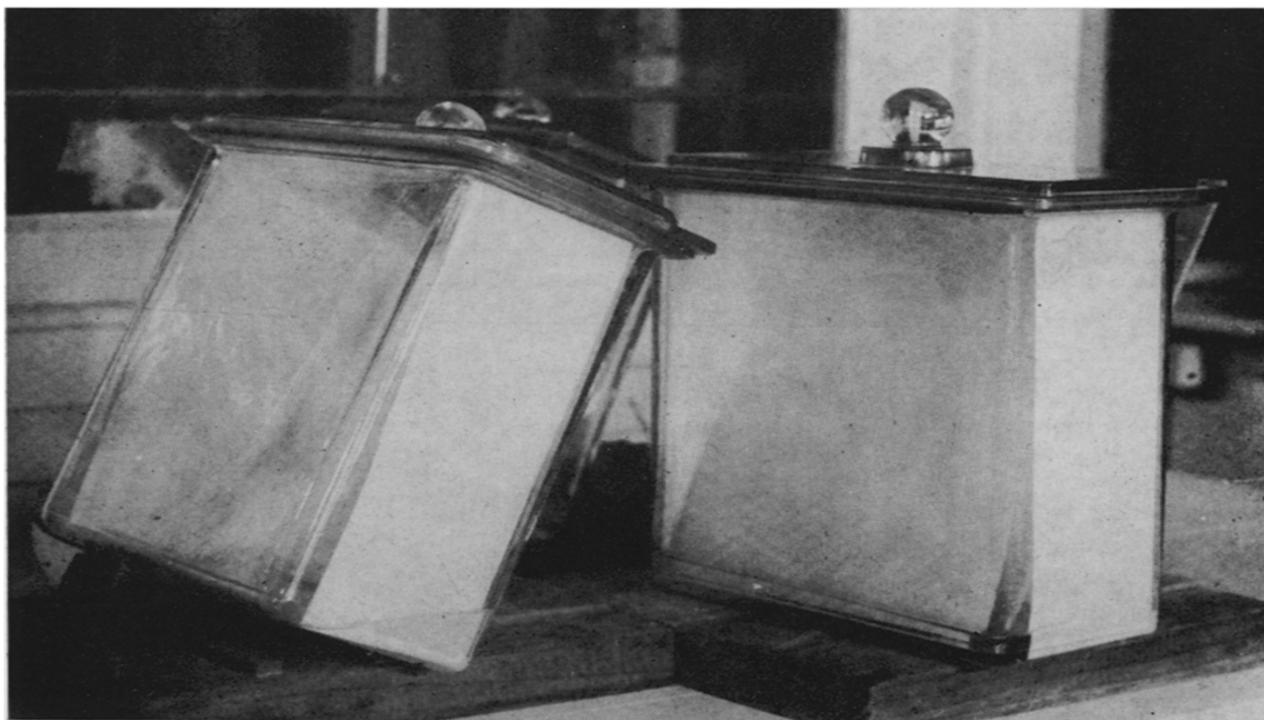


Fig. 3. Photo des cuves en position de saturation et en position de migration.

#### *Solutions à analyser et migration des spots*

Nous avons employé des acides aminés provenant de la firme suisse Fluka. Ces produits sont certifiés chromatographiquement purs par le fournisseur. Ce sont les acides aminés suivants:

(1) DL-Alanine	(8) L-Cystéine, ClH	(15) DL-Ornithine, 2 ClH
(2) $\beta$ -Alanine	(9) Glycocolle	(16) DL-Histidine, 2 ClH
(3) DL-Phénylalanine	(10) L-Glutamine	(17) DL-Proline
(4) L-Arginine	(11) Acide DL-glutamique	(18) DL-Sérine
(5) DL-Asparagine	(12) DL-Leucine	(19) DL-Tryptophane
(6) Acide DL-aspartique	(13) DL-Lysine, ClH	(20) DL-Thréonine
(7) Acide $\gamma$ - <i>n</i> -aminobutyrique	(14) DL-Méthionine	(21) DL-Tyrosine
		(22) DL-Valine

D'autre part, le lysat de coeur étudié nous a été fourni par Riom-Laboratoires, Riom, Puy-de-Dôme, France.

Les solutions étalons de chaque acide aminé sont faites à raison de 100 mg dans 10 ml d'eau contenant 10 % d'alcool isopropylique. Les spots de départ, dans ces conditions sont de 3  $\mu$ l, sauf pour: DL-alanine, 10  $\mu$ l; DL-proline, 8  $\mu$ l; DL-Tyrosine, 20  $\mu$ l.

La solution de lysat de coeur est réalisée dans le même solvant à raison de 50 mg pour 1 ml. Dans ces conditions, le spot de départ est de 15  $\mu$ l.

Sur la plaque, le spot de départ est placé dans un coin, à 2 cm de chaque bord de celle-ci. On a, auparavant, enlevé soigneusement une bande de 3 mm de large de cellulose tout autour de la plaque ainsi que sur son épaisseur, de façon qu'il ne puisse y avoir aucun contact entre la cellulose et le papier de saturation. La plaque ainsi préparée est mise à équilibrer et ensuite démarrée comme il a été expliqué précédemment.

La migration totale s'étend sur 16 cm pour les deux dimensions. La première dimension se fait perpendiculairement au sens d'étalement de la cellulose et évidemment la deuxième est parallèle à ce sens.

### *Systèmes de solvants*

Nous avons commencé nos essais en reprenant le système de solvant préconisé par BISERTE<sup>33</sup>, système que nous utilisons sur papier depuis de nombreuses années :

1<sup>ère</sup> dimension phase supérieure du mélange de PARTRIDGE<sup>34</sup>;

2<sup>ème</sup> dimension phase inférieure du phénol tamponné de LEVY ET CHUNG<sup>35</sup>.

Mais la médiocrité des résultats obtenus a incité à employer, d'abord en essais monodimensionnels, les solvants cités ou essayés par STAHL<sup>36</sup>, FAHMY *et al.*<sup>20</sup> et WOLLENWEBER<sup>24</sup>.

Finalement les meilleures séparations ont été obtenues avec le système signalé par BUJARD<sup>30</sup> et modifié comme suit :

1<sup>ère</sup> dimension : méthanol-chloroforme-ammoniaque à 25 % (2:2:1);

2<sup>ème</sup> dimension : méthanol-pyridine-eau (20:1:5).

### *Révéléateur*

Longtemps fidèles au révélateur ninhydrine à 1 % dans l'acétone tamponnée<sup>35</sup>, nous avons ensuite préféré le réactif de STARON<sup>37</sup>, qui est plus sélectif et plus sensible :

Solution I : méthylcyclohexanol-acétone (3:7, en volume)

Solution II : collidine-lutidine (1:3, en volume)

Révéléateur lui-même : ninhydrine, 2 g; solution II, 2 ml; solution I, q.s.p. 100 ml.

La réaction peut se faire, soit à température ambiante, mais elle demande 12 à 15 h, soit à 65-70° et ne requiert alors que 15 à 20 min. Dans les deux cas, les couleurs peuvent être rapidement avivées par pulvérisation légère d'eau distillée.

### *Résultats*

La séparation de tous les acides aminés envisagés est bonne comme le prouvent les Fig. 4 et 5. La Fig. 4 montre la séparation de tous les acides aminés que nous possédions, la Fig. 5 la séparation des acides aminés contenus dans le lysat de coeur.

Il faut quand même remarquer que cette méthode ne sépare pas la leucine de l'isoleucine et donne des migrations semblables pour la tyrosine et l'alanine. Le premier de ces acides aminés est plus gris que le second tout au début de la révélation, ce qui permet de reconnaître sa présence. Cette méthode, une fois mise au point, nous a permis d'aborder la deuxième partie de ce travail, c'est-à-dire le dosage de certains acides aminés dans un mélange synthétique complexe et dans le lysat de muscle cardiaque que nous possédions.

### DÉTERMINATION QUANTITATIVE

Depuis l'excellente revue de JUTISZ ET DE LA LLOSA<sup>38</sup> et malgré nos recherches bibliographiques nous n'avons trouvés, à part la méthode originale de FRODYMA ET

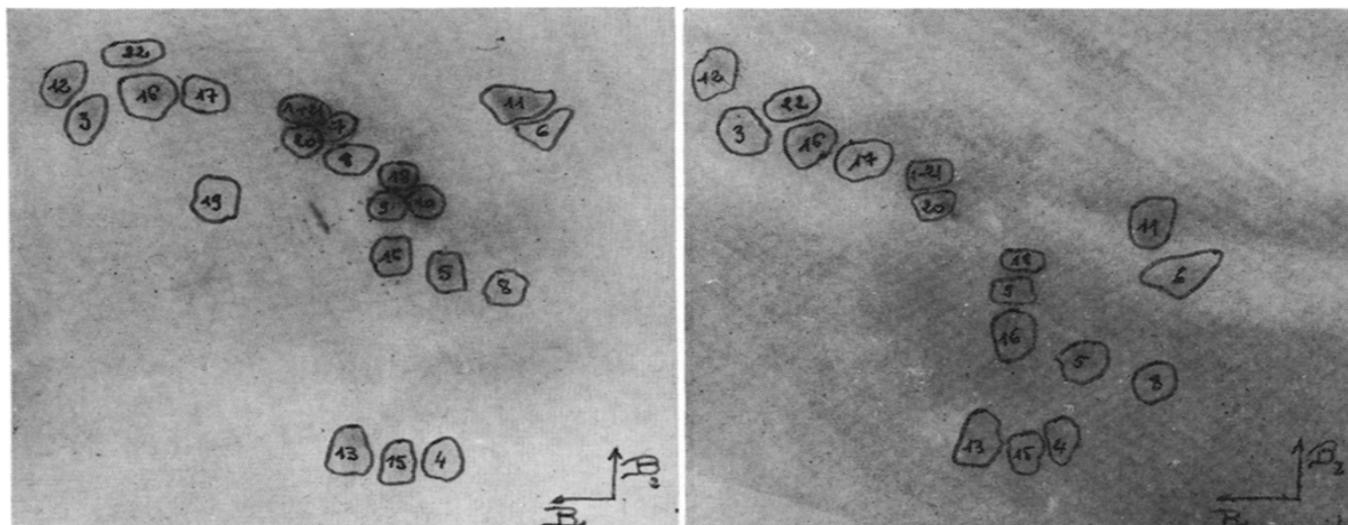


Fig. 4. Séparation des 22 acides aminés à notre disposition.

Fig. 5. Séparation des 18 acides aminés à partir du lysat de coeur.

FREY<sup>30, 40</sup> aucun article relatif au dosage des acides aminés par colorimétrie après élution des taches séparées par chromatographie sur couches minces.

En dépit de quelques essais de révélation différentes<sup>41-45</sup> c'est l'emploi de la ninhydrine qui a prévalu, soit en solution seule<sup>45-48</sup>, soit avec addition de corps donnant plus de sensibilité et de stabilité (Réf. 21, 24, 27, 29, 37, 44, 49-58). Des solutions tamponnées ont permis encore d'améliorer la sensibilité de détection<sup>35, 50-65</sup>. De plus les problèmes de l'éluant et de la totalité de l'élution se sont posés à de nombreux auteurs (Réf. 35, 47, 50, 52, 53, 61, 66, 67).

Alors l'étude de ces diverses méthodes, et aussi certaines nécessités expérimentales nous ont conduit à mettre au point la technique suivante.

#### *Séparation des acides aminés*

Cette séparation se fait, à partir de mélange synthétique, ou à partir de solution de lysat de coeur, de la manière exposée précédemment.

#### *Révélation*

Nous employons le mélange suivant comme révélateur: ninhydrine, 1,0 g; eau bi-distillée, 100 ml; tampon collidine-lutidine, 10 gouttes.

Le tampon utilisé ici est le même que celui décrit dans la première partie de ce travail. Il permet, d'abord une dissolution complète de la ninhydrine et ensuite l'obtention d'un pH optimum de 7.1-7.2.

Les deux migrations étant faites, la plaque est séchée soigneusement sous courant d'air chaud (un sèche-cheveux du commerce), puis on pulvérise le réactif. On amorce ensuite la réaction par passage d'une demi-heure sous le même courant d'air chaud donc à une température comprise entre 50 et 60°. A la fin de cette période, les plaques sont gardées durant 45 h à une température moyenne de 27°, avec une bonne aération. Ces temps et surtout ces températures ont été déterminés de telle sorte que la révélation soit optimum, que le complexe coloré ninhydrine-acide aminé ne soit pas partiellement détruit, et que le fond du chromatogramme ne rosisse pas excessivement.

### Élution des taches

Après migration et révélation, on récupère sur la plaque la totalité de la surface colorée relative à l'acide aminé envisagé, par un grattage méticuleux au moyen d'une spatule souple. On opère de même sur une surface équivalente ne contenant pas d'acides aminés et qui, ainsi, servira de "blanc". Toute la cellulose recueillie est reportée quantitativement dans un petit entonnoir à verre fritté, de porosité 1, tel qu'il est décrit par la Fig. 6.

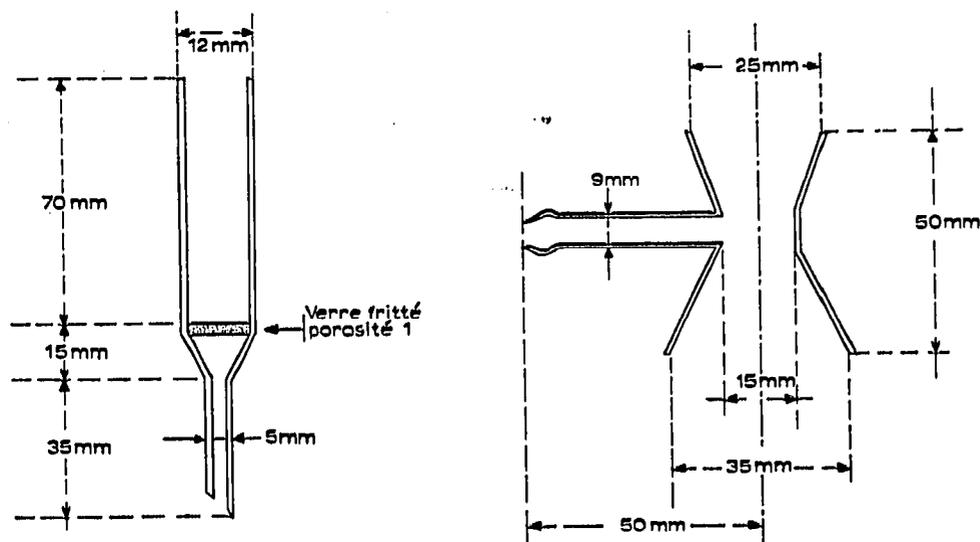


Fig. 6. Croquis du filtre construit spécialement pour l'élution.

Fig. 7. Croquis du dispositif spécial permettant la prise de vide.

Puis l'élution est faite en employant deux fois 2 ml du mélange acétone-eau (3:1). On laisse l'éluant et la cellulose en contact 5 min en agitant au moyen d'une petite spatule en inox. On aspire cet éluant, sous vide léger, dans un tube de Pyrex 18 × 180 en intercalant le petit dispositif en verre donné par la Fig. 7.

L'assemblage complet est indiqué par la Fig. 8.

### Dosage lui-même

La solution colorée ainsi obtenue est passée, dans la demi-heure qui suit l'élution, au spectrophotomètre Maroc de Jobin et Yvon, à la longueur d'onde de 570 m $\mu$  et dans les conditions suivantes: cuve de verre de 1 cm d'épaisseur; sensibilité, position 5; résistance de charge, position 4.

La lecture est faite par rapport au "blanc" obtenu dans les mêmes conditions.

On a pu ainsi établir des courbes d'étalonnage de quatre acides aminés, les acides aspartique et glutamique, la lysine et la valine, et ensuite faire le dosage de ces corps dans le mélange synthétique réalisé par nous, et aussi dans le lysat de coeur mis à notre disposition.

### Courbes d'étalonnage

#### Solutions employées

A partir des solutions mères employées précédemment soit à 100 mg pour 10 ml du mélange isopropanol-H<sub>2</sub>O, on réalise des dilutions de manière à avoir une concentration de 10  $\mu$ g/ $\mu$ l de solvant.

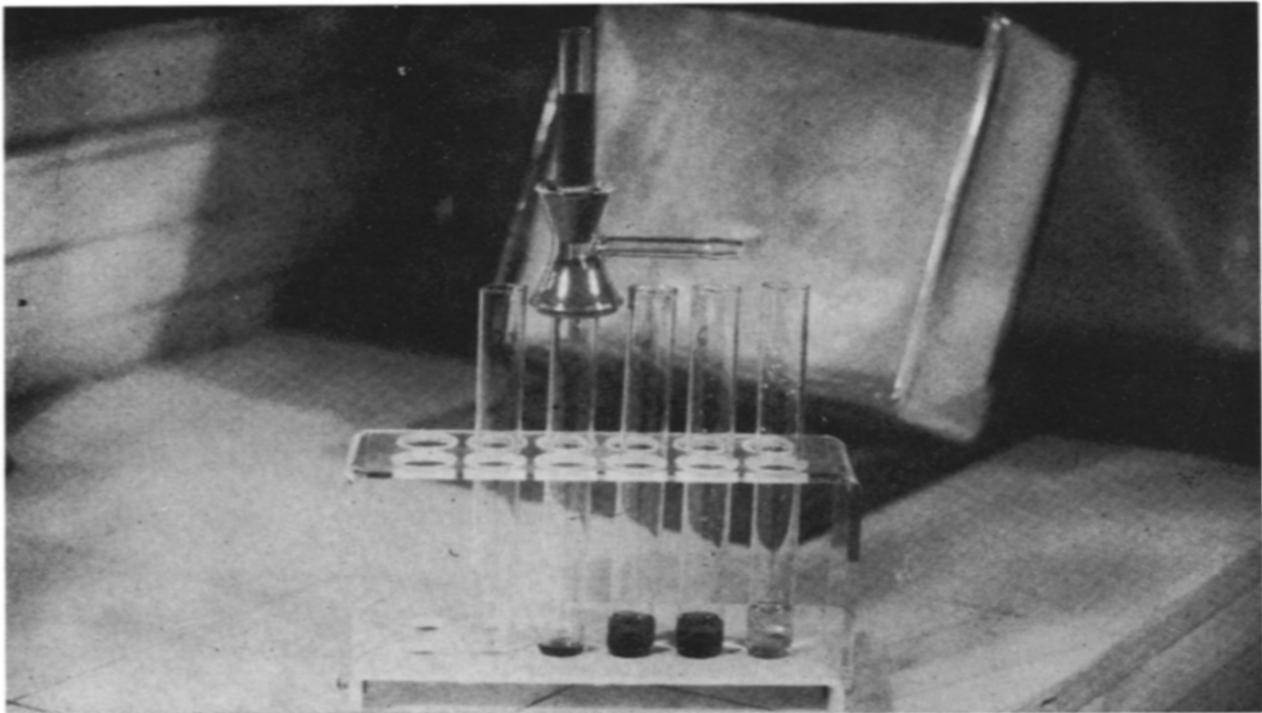


Fig. 8. Filtre et prise de vide en position d'éluion sur tube à essai.

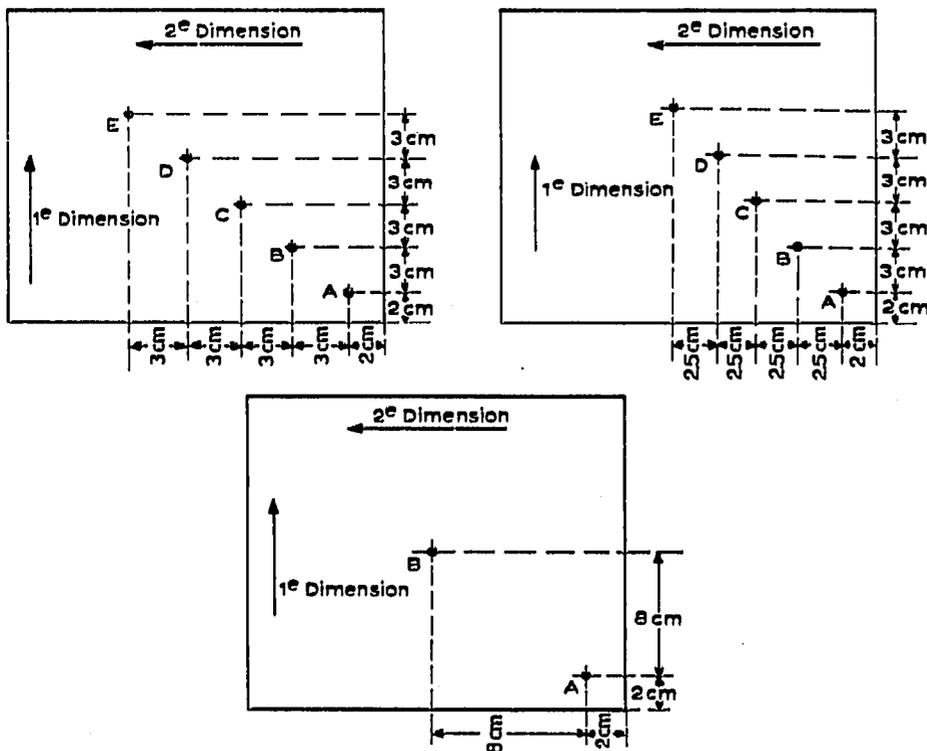


Fig. 9. Disposition des spots de départ pour les acides aspartique et glutamique.

Fig. 10. Disposition des spots de départ pour la lysine.

Fig. 11. Disposition des spots de départ pour la valine.

### Préparation des plaques

Pour avoir des étalonnages comparables, nous avons opéré de telle manière que chaque tache d'acide aminé fasse une migration bi-dimensionnelle dans les mêmes conditions que la solution totale.

Nous avons donc été amenés à adopter la disposition suivante pour les spots étalons :

*Acides aspartique et glutamique.* Nous repérons au crayon les points où nous déposerons les quantités d'acide aminé à doser (Fig. 9). Ces quantités sont les suivantes : en a, 10  $\mu\text{g}$ ; en b, 15  $\mu\text{g}$ ; en c, 20  $\mu\text{g}$ ; en d, 25  $\mu\text{g}$ ; en e, 30  $\mu\text{g}$ . Puis, nous faisons migrer les deux solvants dans les conditions précédemment indiquées.

*Lysine.* La même disposition que précédemment est utilisée, mais les distances entre les spots de départ sont légèrement changées. La migration des solvants se fait dans le sens indiqué sur la Fig. 10.

*Valine.* Ici, il existe une petite différence par rapport aux autres cas. En effet, la valine migrant loin, aussi bien dans un solvant que dans l'autre, il a fallu opérer sur deux plaques pour avoir quatre points d'étalonnage.

Nous avons donc employé deux plaques de la façon indiquée sur la Fig. 11 et les quantités suivantes ont été déposées :

1<sup>ère</sup> plaque: point a, 10  $\mu\text{g}$ ; point b, 15  $\mu\text{g}$ ;

2<sup>ème</sup> plaque: point a, 20  $\mu\text{g}$ ; point b, 25  $\mu\text{g}$ .

Ces deux plaques ont migré simultanément. Elles ont été disposées dos-à-dos dans la même cuve.

### Résultats de ces étalonnages

On trouvera sur le Tableau I, pour chaque acide aminé envisagé, les densités optiques moyennes obtenues pour chaque quantité déposée et finalement l'écart moyen sur les densités optiques ainsi obtenues après élution et dosage des taches telles qu'elles se présentent sur les Fig. 12-15.

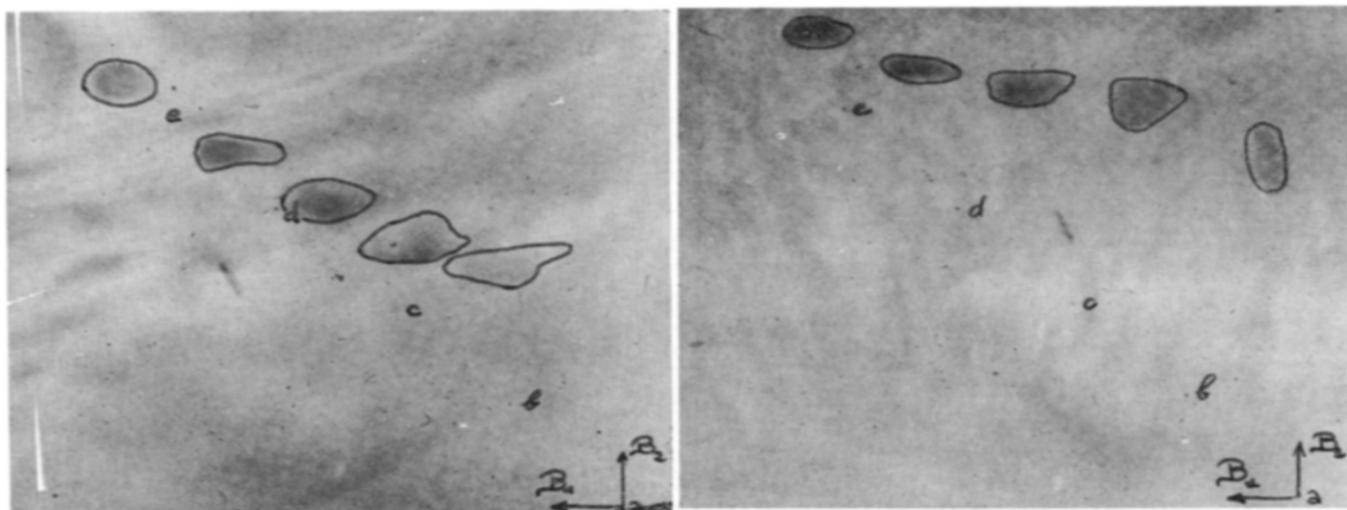


Fig. 12. Chromatographie de l'étalonnage en acide aspartique.

Fig. 13. Chromatographie de l'étalonnage en acide glutamique.

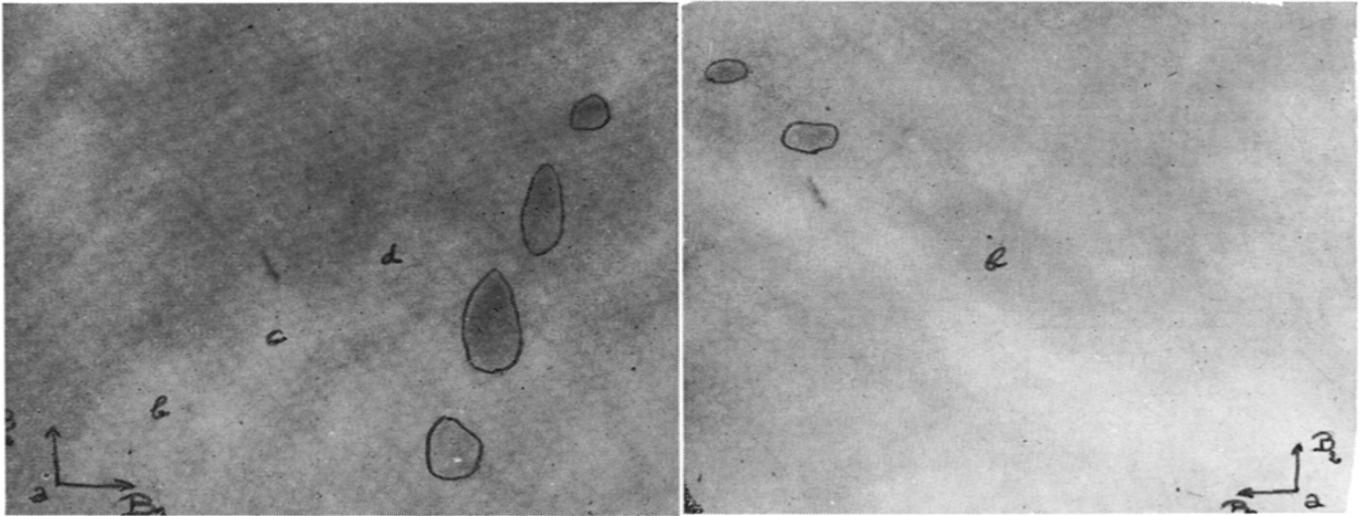


Fig. 14. Chromatographie de l'étalonnage en lysine.

Fig. 15. Chromatographie de l'étalonnage en valine.

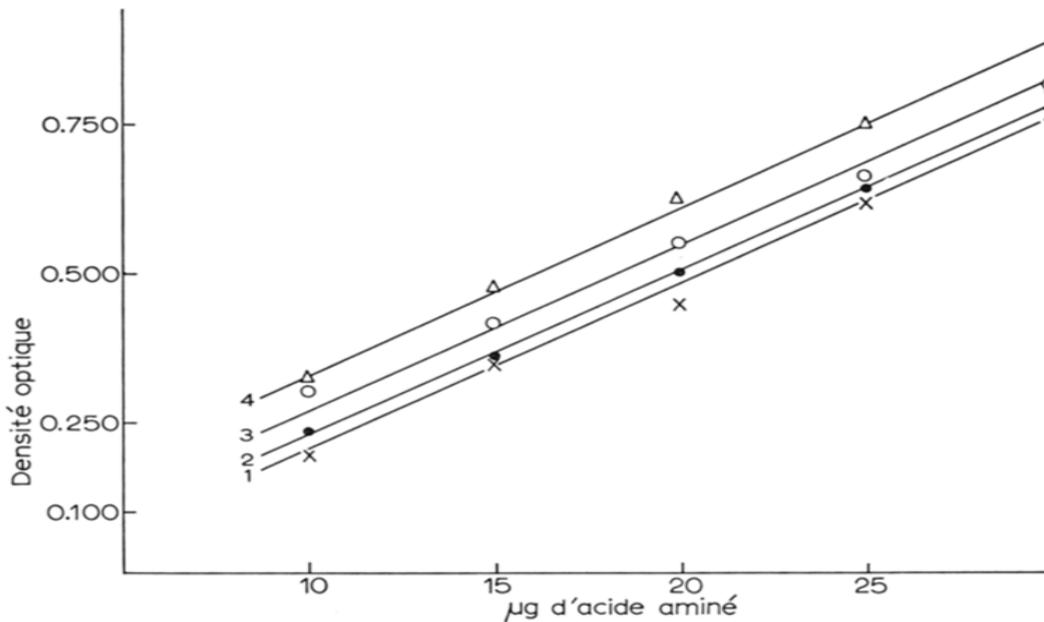


Fig. 16. Courbes d'étalonnage pour les quatre acides aminés dosés. 1 = Acide glutamique; 2 = acide aspartique; 3 = lysine; 4 = valine.

*Courbes d'étalonnage.* A l'aide de ces résultats, nous avons pu tracer les courbes d'étalonnage (Fig. 16), courbes auxquelles nous comparons les résultats obtenus pour les dosages des acides aminés envisagés, à la fois en solution synthétique et dans le lysat de coeur étudié.

### Résultats expérimentaux

#### Résultats sur acides aminés en solution complexe

On a fait une solution des quatre acides aminés à doser et on a déposé au point de départ un spot contenant 20 µg de chacun de ces corps.

TABLEAU I

ÉTALONNAGE DES QUATRE ACIDES AMINÉS ENVISAGÉS

	Acide aspartique			Acide glutamique			Lysine			Valine				
	Quantité (µg)	Densité optique moyenne	Écart % Erreur	Quantité (µg)	Densité optique moyenne	Écart % Erreur	Quantité (µg)	Densité optique moyenne	Écart % Erreur	Quantité (µg)	Densité optique moyenne	Écart % Erreur		
10	0.234	0.015	6.5	0.193	0.010	5.2	10	0.326	0.012	3.7	10	0.306	0.026	8.5
15	0.360	0.015	4.1	0.349	0.026	7.4	15	0.416	0.017	4.1	15	0.479	0.043	8.9
20	0.501	0.018	3.6	0.444	0.044	10.0	20	0.546	0.019	3.5	20	0.626	0.045	7.2
25	0.640	0.029	4.5	0.616	0.031	5.0	25	0.663	0.034	5.1	25	0.750	0.031	4.1
30	0.804	0.037	4.6	0.764	0.018	2.4	30	0.913	0.018	2.2				

TABLEAU II

DENSITÉS OPTIQUES OBTENUES POUR LES QUATRE ACIDES AMINÉS ENVISAGÉS DANS LE CAS D'UNE SOLUTION COMPLEXE

	Essai					Total	Moyenne	Écart moyen	Quantité trouvée (µg)	Écart récupéré	% Écart
	1	2	3	4	5						
Acide aspartique	0.438	0.498	0.478	0.458	0.578	2.450	0.490	0.038	19.6 ± 1.2	-0.4	-2.0
Acide glutamique	0.473	0.469	0.560	0.388	0.469	2.379	0.476	0.038	19.7 ± 1.2	-0.3	-1.5
Lysine	0.508	0.454	0.634	0.558	0.586	2.740	0.548	0.074	19.8 ± 2.6	-0.2	-1.0
Valine	0.540	0.550	0.730	0.720	0.640	3.180	0.636	0.075	20.9 ± 2.7	+0.9	+4.5

TABLEAU III

DENSITÉS OPTIQUES OBTENUES POUR LES QUATRE ACIDES AMINÉS DANS LE CAS DE LYSAT DE COEUR

	<i>Acide aspartique</i>		<i>Acide glutamique</i>		<i>Lysine</i>		<i>Valine</i>	
	<i>Densité optique</i>	<i>Écart densité optique</i>	<i>Densité optique</i>	<i>Écart densité optique</i>	<i>Densité optique</i>	<i>Écart densité optique</i>	<i>Densité optique</i>	<i>Écart densité optique</i>
	0.570	0.037	0.715	0.002	0.735	0.008	0.875	0.018
	0.630	0.023	0.695	0.022	0.755	0.012	0.825	0.032
	0.630	0.023	0.705	0.012	0.675	0.068	0.815	0.042
	0.625	0.018	0.680	0.037	0.795	0.052	0.875	0.018
	0.570	0.037	0.745	0.028	0.750	0.007	0.845	0.014
	0.580	0.027	0.725	0.008	0.680	0.063	0.900	0.040
	0.575	0.032	0.720	0.003	0.740	0.003	0.840	0.018
	0.600	0.007	0.735	0.018	0.755	0.012	0.895	0.035
	0.645	0.038	0.740	0.023	0.785	0.042	0.875	0.018
	0.645	0.038	0.710	0.007	0.780	0.037	0.835	0.022
Total	6.070	0.280	7.170	0.163	7.430	0.294	8.575	0.257
Moyenne	0.607	0.028	0.717	0.016	0.743	0.029	0.857	0.026
Quantité trouvée (µg)	23.6	0.095	28.4	0.60	27.1	1.10	28.9	0.90
Quantité pour 100 mg	3.146	0.063	3.796	0.40	3.612	0.70	3.852	0.6

Le Tableau II donne les différentes densités optiques trouvées, ainsi que l'écart moyen, la quantité récupérée, l'écart par rapport à la quantité déposée et le pourcentage de cet écart.

#### *Résultats obtenus sur le lysat de coeur*

Ce lysat est mis en solution aqueuse à raison de 50 mg/ml, et l'on dépose 15 µl pour former le spot de départ.

Le Tableau III donne, pour les quatre acides aminés, les densités optiques obtenues sur dix mesures, la densité optique moyenne, la quantité d'acide aminé dosé et cette même quantité ramenée à 100 mg de lysat de coeur.

#### *Conclusions*

La méthode que nous venons d'exposer offre des avantages certains :

*Sa vitesse d'exécution* est remarquable, car, contrairement à ce qui se passe avec de nombreuses autres méthodes, il ne faut pas une journée complète pour avoir une séparation détaillée, bi-dimensionnelle, des acides aminés. Si la partie quantitative de la méthode nécessite 48 h, c'est un temps nettement inférieur à tous ceux indiqués pour une méthode semblable faisant intervenir élution des taches et dosage colorimétrique. Evidemment, si d'autres techniques peuvent être plus rapides, elles nécessitent aussi des appareillages plus complexes et plus coûteux<sup>39,40</sup>.

*La reproductibilité qualitative*, en prenant les précautions indiquées dans cet exposé, est excellente et les séparations des acides aminés sont bonnes. Le cas de l'alanine et de la tyrosine, non séparables par notre système, est évidemment à relever, mais d'autres couplages de solvants, actuellement à l'étude, permettront de

résoudre cette difficulté qui n'était que minime ici, à côté de la bonne résolution de tous les autres acides aminés envisagés.

On doit aussi souligner, du fait de la technique de préparation des plaques employées, la robustesse des couches de cellulose plus amidon.

Du point de vue quantitatif, on doit remarquer la bonne sensibilité de la méthode, la facilité de récupération des acides aminés ainsi que leur excellente élution se traduisant par un pourcentage d'écart de récupération inférieur ou au plus égal à 5 %, inférieur à ceux donnés par la chromatographie sur papier.

Ainsi donc, cette technique qui ne se prétend pas parfaite pourra aider les nombreux chercheurs qui se consacrent au domaine si complexe des acides aminés, protéines et peptides.

#### Remerciements

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur DUCHENE-MARULLAZ, Directeur Scientifique du C.E.R.M., pour la bienveillante attention qu'il a apportée à ce travail, ainsi que Madame CHRISTIANE FREJAT dont l'aide technique nous a été précieuse.

#### RÉSUMÉ

Le présent travail donne tout d'abord une nouvelle séparation chromatographique sur plaque de cellulose d'acides aminés et dans une deuxième partie, développe une méthode de dosage par colorimétrie de certains de ces acides aminés après séparation et élution des taches par un solvant approprié.

#### SUMMARY

A new method for the separation of  $\alpha$ -amino acids on cellulose thin layers is described in the first part of this work. In the second part a colorimetric method for the determination of some of these  $\alpha$ -amino acids after elution is developed.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. CONSDEN, A. H. CORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- 2 N. A. ISMAILOV ET M. S. SHRAIBER, *Farmatsiya (Sofia)*, 3 (1938) 1.
- 3 J. E. MEINHARD ET N. F. HALL, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 185.
- 4 J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER ET G. E. KELLER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 420.
- 5 E. STAHL, *Pharmazie*, 11 (1956) 633.
- 6 E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 82 (1958) 323.
- 7 E. STAHL, *Parfüm. Kosmetik*, 39 (1958) 564.
- 8 E. STAHL, *Pharm. Rundschau*, 2 (1959) 1.
- 9 E. STAHL, *Angew. Chem.*, 73 (1961) 646.
- 10 M. KANDATSU ET H. NAITO, *Nippon Nogeï Kagaku Kaishi*, 33 (1959) 170.
- 11 M. BRENNER ET A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 16 (1960) 378.
- 12 M. BRENNER ET A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 17 (1961) 237.
- 13 G. PATAKI, *Z. Klin. Chem.*, 1, No. 5 (1963) 157.
- 14 G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 580.
- 15 L. CODERN, J. GADEA, E. GAL ET M. MONTAGUT, *Afinidad*, 20, No. 225 (1963) 159.
- 16 E. MUTSCHLER ET H. ROCHELMAYER, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 449.
- 17 M. MOTTIER, *Mitteilungsgeb. Lebensm. Hyg.*, 49 (1958) 654.
- 18 L. RASTEIKIENE ET T. PRANSKIENE, *Lietuvos TSR Mokslu Akad. Darbai, Ser. B*, 3 (1963) 59.
- 19 S. MUSA ET H. OCHI, *Bunseki Kagaku*, 14, No. 3 (1965) 202.
- 20 A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI ET M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.

- 21 B. SHASHA ET R. L. WHISTLER, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 532.
- 22 H. DETERMANN, *Experientia*, 18 (1962) 430.
- 23 D. CORBI, *Giorn. Med. Mil.*, 114, No. 2 (1964) 168.
- 24 P. WOLLENWEBER, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 369.
- 25 T. DITTMANN, *Z. Klin. Chem.*, 1, No. 6 (1963) 190.
- 26 M. L. WOLFROM, D. L. PATIN ET R. M. DE LEDERKREMER, *Chem. Ind. (London)*, 25 (1964) 1065.
- 27 P. BLANC, P. BERTRAND, G. DE SAQUI-SANNES ET R. LESCURE, *Chim. Anal.*, 47, No. 6 (1965), 285.
- 28 R. L. MUNIER ET G. SARRAZIN, *Bull. Soc. Chim. France*, 5 (1965) 1490.
- 29 EL. BUJARD, 3e Symp. *Chromatog.*, Bruxelles, 14 et 15 Sep. 1964; *J. Pharm. Belg.*, 20 (1965) 413; *J. Chromatog.*, 21 (1966) 19.
- 30 P. DE LA LLOSA, C. TERTRIN ET M. JUTISZ, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 136.
- 31 N. A. TURNER ET R. J. REDGWELL, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 129.
- 32 C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 46 (1963) 1730, 1772.
- 33 G. BISERTE, P. BOULANGER ET P. PAYSANT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 2067.
- 34 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 241.
- 35 A. L. LEVY ET D. CHUNG, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 396.
- 36 E. STAHL, *Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, New-York, 1965, p. 399.
- 37 T. STARON, communication personnelle.
- 38 M. JUTISZ ET P. DE LA LLOSA, *Bull. Soc. Chim. France*, 12 (1963) 2913.
- 39 M. M. FRODYMA ET R. W. FREI, *J. Chromatog.*, 15 (1964) 501.
- 40 M. M. FRODYMA ET R. W. FREI, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 131.
- 41 D. MUTING, *Naturwiss.*, 39 (1952) 548.
- 42 J. BARROLIER, J. HEILMAN ET E. WATZKE, *Z. Physiol. Chem.*, 304 (1956) 21.
- 43 A. SAID ET D. H. FLEITA, *Chemist-Analyst*, 52 (1963) 79.
- 44 T. KNAUT, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 560.
- 45 N. N. NAZIROV, *Metody Issled. Fiziol. i Biokhim. Khlopchat.*, Akad. Nauk Uzbek. SSR, *Rezultaty Rabot Sovet.*, (1957) 128.
- 46 K. S. AMBE ET A. L. TAPPEL, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 546.
- 47 P. BOHLEV, *Naturwiss.*, 49 (1962) 326.
- 48 N. A. TURNER ET R. J. REDGWELL, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 129.
- 49 T. TSUKAMOTO, T. KOMORI ET N. KINOSHITA, *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 5 (1957) 363.
- 50 G. N. ZAITSEVA ET N. P. TYVLENEVA, *Lab. Delo*, 4, No. 3-4 (1958) 24.
- 51 T. TSUKAMOTO ET T. KOMORI, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 8 (1960) 913.
- 52 E. R. COOK ET M. LUSCOMBE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 75.
- 53 J. BARROLIER, *Naturwiss.*, 42 (1955) 416.
- 54 J. HEILMANN, J. BARROLIER ET E. WATZKE, *Z. Physiol. Chem.*, 309 (1958) 219.
- 55 T. BORKOWSKI ET I. MADECKA-BORKOWSKA, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 4 (1959) 119.
- 56 E. MOFFAT ET R. LYTLE, *Anal. Chem.*, 31 (1956) 926.
- 57 E. MACEVOY-BOWE ET J. W. H. LUGG, *Biochem. J.*, 80 (1961) 616.
- 58 S. M. PETROVIC ET S. E. PETROVIC, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 313.
- 59 S. MOORE ET W. STEIN, *J. Biochem.*, 176 (1948) 267.
- 60 P. H. BELL, K. S. HOWARD, R. G. SHEPHERD, B. M. FINN ET J. H. MEISENHEDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 5051, 5067.
- 61 Y. WATANABE, K. WATANABE, F. KOIDE, T. SAITO ET K. SHIMURA, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 34 (1960) 620.
- 62 B. ORCHARD, *Nature*, 198 (1963) 688.
- 63 R. BONDIVENNE, M. COULET, G. BETAÏL, N. BUSCH ET R. Y. MAUVERNAY, *Ann. Pharm. Franc.*, 19, No. 7 (1961) 523.
- 64 E. A. ERMAKOVA, *Biokhimiya*, 22 (1957) 917.
- 65 H. WIEWIOROWSKI, J. PRZYBYLSKA ET Z. KOCIALKOWSKI, *Roczniki Nauk Rolniczych, Ser. A*, 79 (1958) 453.
- 66 C. A. PORTER, D. MARGOLIS ET P. SHARP, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 18 (1957) 465.
- 67 T. STARON, C. ALLARD ET M. M. CHAMBRE, *Compt. Rend.*, 253 (1961) 1630.