

CHROM. 4529

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE NITRILES

II. APPLICATION À L'IDENTIFICATION D'ACIDES α -AMINÉS ISOMÈRES

G. A. DARDENNE, M. SEVERIN ET M. MARLIER

Laboratoire de Chimie Organique, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux (Belgique)

(Reçu le 4 novembre 1969)

SUMMARY

Gas chromatography of nitriles. II. Application to the identification of isomeric α -amino acids

A method is described for the gas chromatography of isomeric amino acids as their nitrile derivatives. Good separations of two C_5 , three C_6 and four C_7 isomeric amino acids were obtained on a column of FFAP.

INTRODUCTION

En vue de la recherche d'une méthode générale d'analyse par chromatographie en phase gazeuse de mélanges d'acides aminés, SEVERIN ET RENARD¹ ont étudié l'action de l'hypochlorite de soude. Les acides aminés ont été traités par une solution d'hypochlorite en excès à la température de 60° en présence d'un tampon à pH 10.8.

Dans ces conditions, et contrairement aux études entreprises par ENGFELD² et par BAYER³, il ne se forme pas d'aldéhydes. En effet, l'analyse de l'extrait étheré du mélange réactionnel acide aminé-NaOCl par chromatographie en phase gazeuse utilisant l'Huile de Silicone 550 (Carlo Erba) comme phase stationnaire, montre la présence d'un pic important pour chaque acide aminé testé mais le volume de rétention de ce pic ne correspond pas à celui se rapportant à l'aldéhyde en C_{n-1} correspondant.

L'emploi conjoint de la chromatographie gazeuse et de l'analyse qualitative organique a permis de conclure sans aucun doute que les produits formés dans ces conditions sont les nitriles en C_{n-1} . Les résultats obtenus lors de cette étude ont été confirmés presque en même temps par MCGREGOR ET CARPENTER⁴ qui travaillaient en présence d'hypobromite de sodium.

Dans le cadre de nos travaux sur les acides aminés libres des plantes et en particulier lors de la détermination de la structure de l'acide (L)-2-amino 5-méthyl 4-hexénoïque⁵ que nous avons isolé d'un champignon, *Leucocortinarius bulbiger*, nous

avons été amené à synthétiser et à étudier la séparation de quatre acides aminés isomères en C₇ à savoir les acides DL-2-amino heptanoïque, 2-amino 3-méthyl hexanoïque, 2-amino 4-méthyl hexanoïque et 2-amino 5-méthyl hexanoïque.

La chromatographie sur papier et sur couche mince, généralement utilisée pour l'étude des acides aminés, ne nous ont pas permis la séparation de ces différents isomères malgré des essais avec plus de trente paires de solvants. La transformation de ces acides aminés en nitriles et l'examen de ceux-ci par chromatographie en phase gazeuse s'est révélée très intéressante pour l'identification des acides aminés d'un mélange aussi complexe.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

En plus des quatre acides aminés en C₇, nous avons étudié la séparation de deux groupes d'acides aminés isomères qui se séparent difficilement par chromatographie sur papier et sur couche mince. Ce sont la DL-valine et DL-norvaline ainsi que la DL-leucine, DL-isoleucine et DL-norleucine.

Les acides aminés sont des produits Mann, qualité MA excepté les quatre acides aminés en C₇ que nous avons synthétisés. Ils sont tous chromatographiquement purs.

Synthèse des acides aminés en C₇

Nous avons adapté la méthode générale d'ALBERTSON⁶ utilisant l'acétamidocyanoacétate d'éthyle. L'alkylation a été effectuée en chauffant à reflux dans l'alcool absolu, le sel de sodium de l'acétamidocyanoacétate d'éthyle avec 10% en excès de l'halogénure d'alkyle correspondant. Les esters obtenus ont été hydrolysés en acides aminés par chauffage en milieu acide sauf pour l'ester du 2-amino 3-méthyl hexanoïque qui a été hydrolysé en milieu basique. Les acides aminés ont été précipités par la pyridine ou séparés par passage sur résines échangeuses d'ions. Ils ont été recristallisés dans un mélange eau-éthanol.

Préparation de nitriles à partir d'acides aminés

A 3 mg d'acide aminé, on ajoute 4 ml de tampon à pH 10.8 et 5 ml d'une solution commerciale d'hypochlorite de soude. On laisse le mélange réactionnel réagir pendant 4 h à 60° au bain-marie en prenant soin d'agiter énergiquement la solution tous les quarts d'heure. On refroidit alors rapidement à 0° et on extrait avec 3 × 10 ml d'éther. L'extrait étheré est séché sur sulfate de magnésium anhydre et ensuite évaporé à faible volume (± 1 ml). Afin de minimiser les pertes en nitriles, on utilise une petite colonne à anneaux de Raschig. Une prise d'essai de 1 μ l est alors analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Séparation chromatographique des nitriles

Les nitriles ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse sur la base des résultats obtenus précédemment sur des colonnes de FFAP, Porapak R-FFAP et Silicone XF 1150⁷. Nous avons en plus effectué la séparation des nitriles dérivés d'acides aminés en isothermie sur une colonne de FFAP. Les conditions de travail pour cette analyse sont les suivantes:

Appareil: Aerograph Moduline 1520

Colonne: inoxydable, 2 m × 1/8 in.

Support: Chromosorb W, regular, 60-80 mesh

Phase stationnaire: FFAP 16%; poids de phase: 3.2 g

Températures: détecteur, 145°; injecteur, 205°; colonne, 65°

Gaz vecteur et débit: N₂, 30 ml/min

Détecteur: ionisation de flamme; H₂, 30 ml/min

Enregistreur: Graphispot, 12 mm/min

TABLEAU I

VOLUMES DE RÉTENTION (ml) DE NITRILES DÉRIVÉS D'ACIDES AMINÉS

Acides aminés	Nitriles en C _{n-1} correspondants	Colonnes				
		FFAP, temp. programmée ^a	FFAP, isothermie	Porapak R + FFAP ^a	Silicone XF 1150 ^a	Huile de Silicone 550 (Carlo Erba) ¹
Valine	Isobutyronitrile	94	113	284	190	100
Norvaline	Butyronitrile	159	194	336	317	156
Isoleucine	2-Méthyl butyronitrile	150	182	406	337	213
Leucine	3-Méthyl butyronitrile	184	225	427	383	241
Norleucine	Pentanenitrile	270	298	472	480	365
2-Amino 3-méthyl hexanoïque	2-Méthyl pentanenitrile	240	338	535	480	
2-Amino 4-méthyl hexanoïque	3-Méthyl pentanenitrile	326	415	576	539	
2-Amino 5-méthyl hexanoïque	4-Méthyl pentanenitrile	340	440	576	555	
2-Amino heptanoïque	Hexanenitrile	395	593	606	605	

^a Séparation sur la colonne No. 67.

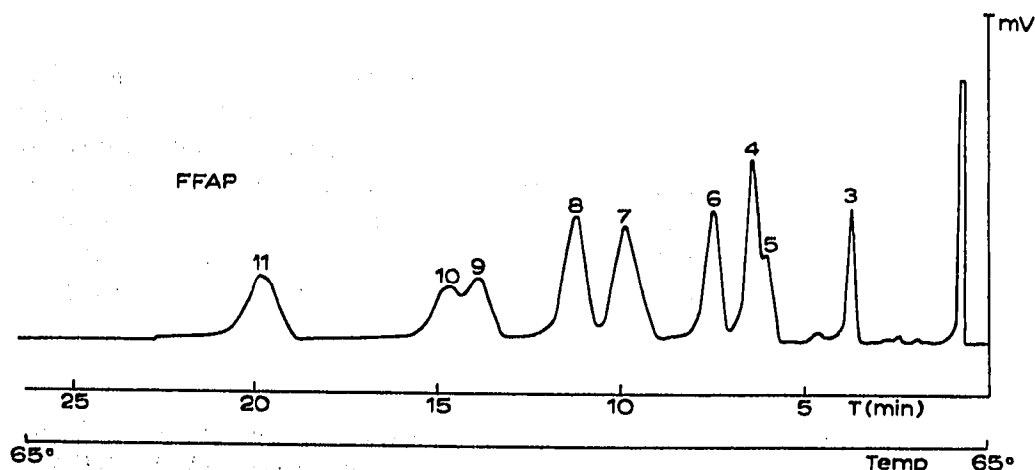


Fig. 1. Séparation d'acides aminés sous forme de nitriles sur une colonne de FFAP en isothermie. 3 = 2-méthyl propionitrile; 4 = butyronitrile; 5 = 2-méthyl butyronitrile; 6 = 3-méthyl butyronitrile; 7 = pentanenitrile; 8 = 2-méthyl pentanenitrile; 9 = 3-méthyl pentanenitrile; 10 = 4-méthyl pentanenitrile; 11 = hexanenitrile.

Les volumes de rétention obtenus avec les nitriles sur FFAP en isothermie, FFAP en température programmée, sur Porapak R-FFAP et sur Silicone XF 1150 sont repris au Tableau I.

La Fig. 1 montre la séparation de neuf nitriles sur FFAP en isothermie.

CONCLUSIONS

Les séparations d'acides aminés à grande mobilité et en particulier les études de leurs isomères sont très difficiles par les techniques chromatographiques classiques (papier et couche mince). Il est souvent impossible d'identifier en mélange certains isomères et en particulier les acides aminés en C₇. La transformation des acides aminés en nitriles par la méthode à l'hypochlorite de soude résout aisément ces difficultés. L'isobutyronitrile et le butyronitrile, dérivés de la valine et de la norvaline se séparent parfaitement sur toutes les colonnes étudiées. Signalons cependant que le pic de l'isobutyronitrile interfère avec celui de l'acétonitrile sur FFAP et avec celui du propionitrile sur Silicone XF 1150. Les nitriles dérivés des trois leucines se séparent le mieux sur FFAP et sur Porapak R-FFAP.

Une remarque importante doit être faite au sujet de ces différentes interférences en chromatographie en phase gazeuse. En effet, elles ne portent guère à conséquence car il est très facile d'identifier les acides aminés dont dérivent ces nitriles par chromatographie bidimensionnelle sur papier et sur couche mince. Ainsi, en utilisant pour la première dimension le mélange *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10) et pour la seconde dimension le phénol tamponné à pH 4.2, on peut identifier en mélange et sans aucune difficulté l'alanine et la valine ainsi que l'isoleucine et la norvaline.

La transformation d'acides aminés en nitriles et l'étude de ceux-ci par chromatographie en phase gazeuse permet donc de résoudre des problèmes de séparation impossibles par les autres techniques. De plus, il est possible de travailler sur des quantités d'acides aminés de l'ordre de 500 µg, ce qui est très intéressant lors d'études sur la structure de nouveaux acides aminés libres isolés du règne végétal.

RÉSUMÉ

Nous avons décrit une méthode permettant d'étudier par chromatographie en phase gazeuse des mélanges d'acides aminés isomères après les avoir transformés en nitriles en C_{*n*-1}. Il est possible d'identifier en mélange deux acides aminés isomères en C₅, trois en C₆ et quatre en C₇ sur une colonne de FFAP.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. SEVERIN ET M. RENARD, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 12 (1963) 649.
- 2 N. O. ENGFELD, *Z. Physiol. Chem.*, (1922) 121.
- 3 E. BAYER, dans D. H. DESTY (Rédacteur), *Gas Chromatography*, Butterworths, London, 1958, p. 333.
- 4 W. H. MCGREGOR ET F. H. CARPENTER, *Biochemistry*, 1 (1962) 53.
- 5 G. A. DARDENNE, J. CASIMIR ET J. JADOT, *Phytochemistry*, 7 (1968) 1401.
- 6 N. F. ALBERTSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (1946) 451.
- 7 G. A. DARDENNE, M. SEVERIN ET M. MARLIER, *J. Chromatog.*, 47 (1970) 176.