

CHROM. 7459

Note

Analyse des acides aminés en présence de glucosamine en tampons aux sels de lithium sur une seule colonne échangeuse d'ions

JEAN-FRANÇOIS BOUHOURS

Unité de Recherches de Physiopathologie Digestive, INSERM U 45, Hôpital Edouard-Herriot, 69374 Lyon Cedex 2 (France)

(Reçu le 2 janvier 1974)

L'emploi des tampons au citrate de lithium tend à se substituer peu à peu aux sels de sodium pour analyser les acides aminés des liquides physiologiques en chromatographie échangeuse d'ions. Les mélanges d'acides aminés contenant de la glucosamine, comme on en trouve fréquemment dans les hydrolysats de glycoprotéines purifiées ou de fractions membranaires complexes, ont également été analysés dans ce système tampon en utilisant la technique exposée ici.

Benson *et al.*¹ suivant une indication de Moore et Stein² ont décrit une méthode par laquelle les acides aminés acides et neutres sont séparés sur une colonne à l'aide de deux tampons au citrate de lithium. Ils ont obtenu une résolution accrue permettant notamment de quantifier séparément la glutamine et l'asparagine.

Kedenburg³ a décrit les conditions permettant l'analyse de tous les acides aminés sur une seule colonne à l'aide de deux tampons: le premier est identique au premier tampon de Benson *et al.*¹, le second de pH plus élevé a une forte concentration en ions lithium (Tableau I).

L'analyse d'un hydrolysat d'acides aminés selon les conditions de Kedenburg s'est révélée insatisfaisante sur deux points: (1) Le passage du tampon 1 au tampon 2 provoque la sortie groupée de quatre acides aminés, à savoir, la cystéine, la méthionine, l'isoleucine et la leucine, ce qui rend leur évaluation impossible (Tableau II, colonne 1). (2) La glucosamine fréquemment présente dans les hydrolysats de protéines interfère avec la valine.

CONDITIONS GÉNÉRALES D'ANALYSE DES ACIDES AMINÉS

L'échantillon dissous dans le tampon lithium à pH 2.20 (Tableau I) et déposé sur la colonne sous un volume de 0.5 ml doit contenir en moyenne 0.1 μ M de chaque acide aminé.

L'analyse est effectuée sur un appareil Unichrom Beckman avec une colonne de 0.9 \times 60 cm remplie de 50 g de résine M 72. L'élution des acides aminés est réalisée avec les tampons décrits au Tableau I pompés à 70 ml/h. La température fixée à 39° pendant l'équilibration de la colonne et le début de l'analyse est portée à 60° après l'élution des acides aminés acides et neutres. Le début du changement de température ainsi que le mode du changement de tampon est décrit ci-dessous.

TABLEAU I

COMPOSITION DES SOLUTIONS TAMPON POUR LA CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES AMINÉS D'APRÈS KEDENBURG³

Le thiodiglycol n'a pas été utilisé. Le pH des tampons a été modifié pour séparer la valine de la glucosamine.

| Composition | Tampon | | |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|
| | Pour la dilution des échantillons | Tampon 1 | Tampon 2 |
| pH | 2.20 | 2.80-2.70 | 4.10-4.25 |
| Molarité | | | |
| en ions lithium | 0.30 | 0.30 | 1.20 |
| en ions citrate | 0.10 | 0.05 | 0.21 |
| Citrate de lithium, g | 14.1 | 150.5 | 602 |
| Chlorure de lithium, g | | 59.5 | 238 |
| HCl concentré. | | | |
| volume approximatif, ml | 14 | 130 | 260 |
| Acide caprylique, ml | 0.05 | 1 | 1 |
| Volume final, l | 0.5 | 10 | 10 |

La résine Beckman M 72, livrée commercialement sous forme sodium, est mise sous forme lithium en la lavant successivement dans 10 volumes de LiOH 0.9 N, 10 volumes d'eau distillée et 10 volumes de tampon 1 (bibl. 1). La colonne est remplie à la température d'utilisation, régénérée par LiOH 0.3 N pompé pendant 1 h à 35 ml/h et équilibrée pendant 1 h par le tampon 1 au débit normal.

Le réactif à la ninhydrine, composé selon les indications fournies avec l'appareil, est pompé à 35 ml/h. La coloration est développée au bain-marie bouillant dans une bobine de Teflon de longueur simple.

RÉSULTATS

Séparation des pics au changement de tampon

Pour permettre une meilleure séparation des pics au passage du tampon 1 (pH 2.80) au tampon 2 (pH 4.10), un changement continu a été réalisé en utilisant le dispositif de la Fig. 1. La chambre de mélange est constituée d'une seringue à usage unique de 50 ml. Les tampons arrivent à la partie supérieure de la seringue par une aiguille perçant le piston. Le contenu de la seringue est mélangé à l'aide d'un barreau aimanté tournant à la partie inférieure au dessus de l'orifice d'écoulement relié à l'entrée de la pompe tampon. Au début de l'analyse l'entrée de la chambre de mélange est connectée au tampon 1 puis au moment voulu, au tampon 2.

Le gradient obtenu n'est pas linéaire mais exponentiel. La concentration C en ions lithium du tampon peut être exprimée en fonction du volume v ayant traversé la chambre de mélange de volume V depuis l'admission du tampon 2:

$$C = (C_1 - C_2) e^{-\frac{v}{V}} + C_2$$

C_1 et C_2 étant les concentrations respectives des tampons 1 et 2 en ions lithium.

Dans les conditions décrites ci-dessus la concentration en ions lithium atteint 95% de la valeur de C_2 80 min après le début du changement de tampon si le volume

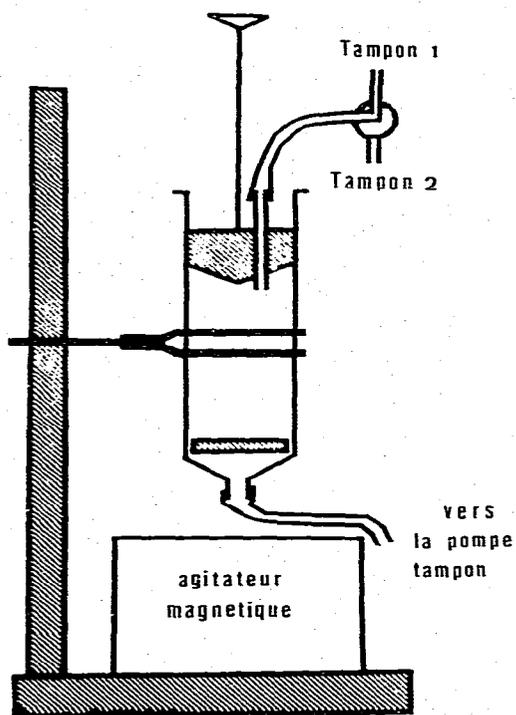


Fig. 1. Système mélangeur pour réaliser un changement continu de tampon. La chambre de mélange est constituée d'une seringue de 50 ml dont le volume peut être modifié en déplaçant le piston.

V est fixé à 35 ml. La séparation des acides aminés incriminés est améliorée mais elle n'est satisfaisante qu'avec un gradient plus faible réalisé avec une chambre de mélange de 50 ml. De cette façon la concentration en ion lithium atteint 95 % de C_2 en 120 min.

Le changement de température a été retardé à 240 min. Dans ces conditions la durée de l'analyse est allongée d'une demie heure environ par rapport aux conditions de Kedenburg³.

Séparation de la glucosamine et de la valine

Au cours de la chromatographie d'un hydrolysate de protéines un épaulement sur la pente descendante du pic de la valine a été identifié comme étant dû à la présence de glucosamine. L'abaissement du pH du tampon 1 augmente le temps de rétention des acides aminés mais affecte proportionnellement beaucoup moins la glucosamine. À pH 2.75 la valine sort après la glucosamine mais les deux pics chevauchent encore. À pH 2.70 la glucosamine sort à équidistance de l'alanine et la valine.

Le changement de température n'est amorcé qu'à 240 min. Le pH du second tampon est augmenté de 4.10 à 4.25 pour ne pas retarder exagérément les acides aminés basiques. Dans ces conditions tous les acides aminés d'un hydrolysate de protéines et la glucosamine sont élués séparément sur une seule colonne en moins de 8 h (Tableau II, colonne 2).

TABLEAU II

TEMPS DE RÉTENTION (MIN) DES ACIDES AMINÉS ET DE LA GLUCOSAMINE EN FONCTION DES CONDITIONS DE CHROMATOGRAPHIE

(1) Conditions de Kedenburg³. (2) Changement de tampons continu avec une chambre de mélange de 50 ml et les tampons 1 et 2 ajustés respectivement aux pH 2.70 et 4.25.

| | 1 | 2 |
|----------------------|------|------|
| Acide aspartique | 52 | 70 |
| Thréonine | 78 | 88 |
| Sérine | 81 | 91 |
| Acide glutamique | 91 | 105 |
| Proline | 123 | 143 |
| Glycocolle | 130 | 149 |
| Alanine | 139 | 161 |
| Changement de tampon | 170* | 170 |
| Glucosamine | 178 | 185 |
| Valine | 176 | 207 |
| Cystéine | 209 | 231 |
| Méthionine | | 237 |
| Isoleucine | 215 | 240* |
| Leucine | 218 | 243 |
| Tyrosine | 237 | 264 |
| Phénylalanine | 247 | 273 |
| NH ₃ | 265 | 322 |
| Lysine | 307 | 354 |
| Histidine | 334 | 381 |
| Arginine | 417 | 465 |

* Début du changement de température de la colonne.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur René Got de nous avoir permis de réaliser ce travail dans son laboratoire. Cette note technique s'inscrit dans un programme soumis au Contrat DGRST No. 72.7.0177 dans le cadre de l'action complémentaire coordonnée Membranes Biologiques — Structure et Fonctions.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. V. Benson, M. J. Gordon et J. A. Patterson, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 228.
- 2 S. Moore et W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
- 3 C. P. Kedenburg, *Anal. Biochem.*, 40 (1971) 35.