

Note

Séparation par chromatographie en phase gazeuse de l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine

CHRISTIAN PERIER, MARIE-CLAIRE RONZIÈRE, ALINE RATTNER et JACQUES FREY  
*Laboratoire de Biochimie, U.E.R. de Médecine, 30, rue Ferdinand Gambon, 42100 Saint-Étienne (France)*  
 (Reçu le 2 février 1976)

Les fibres de collagène sont constituées par des chaînes polypeptidiques, de poids moléculaire 100,000, unies latéralement par des liaisons dites intramoléculaires pour former des tresses à trois brins, ces tresses sont également unies latéralement par des liaisons dites intermoléculaires et constituent ainsi la fibre elle-même. Les liaisons latérales sont des liaisons aldimes ou aldols formées entre une fonction aldéhyde d'un dérivé de la lysine (allysine ou acide  $\alpha$ -amino- $\delta$ -semi-aldéhyde adipique) et une fonction aldéhyde d'une autre molécule d'allysine pour constituer une liaison aldol ou la fonction  $\epsilon$ -aminée d'une molécule de lysine ou d'hydroxylysine pour constituer une liaison aldimine<sup>1-4</sup>. Si un échantillon de collagène est réduit par le borohydrure de sodium<sup>5</sup>, les molécules d'allysine qui ne sont pas incluses dans des liaisons de réticulation seront réduites en  $\epsilon$ -hydroxynorleucine; il en est de même des molécules d'allysine incluses dans des liaisons aldimes lorsqu'elles ont été libérées par une hydrolyse ménagée lors de la préparation du collagène acido-soluble.

Etant donné l'importance de l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine pour apprécier le degré de réticulation d'un échantillon de collagène, mais aussi sa très faible concentration, nous avons cherché à la détecter par chromatographie en phase gazeuse.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Préparation de l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine

Pour réaliser la synthèse de l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine, nous avons suivi la technique proposée par Gaudry<sup>6</sup>. Le produit de départ de cette synthèse est le 2,3-dihydropyranne que l'on hydrolyse en  $\delta$ -hydroxyvaléraldéhyde selon la technique de Schniepp et Geller<sup>7</sup>.

Les étapes de la synthèse sont schématisées sur la Fig. 1. Par hydrolyse barytique de la 5- $\delta$ -hydroxybutylhydantoïne, nous obtenons un produit qui doit être l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine.

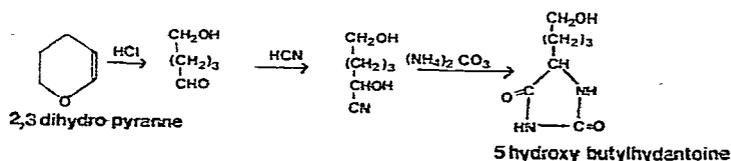


Fig. 1. Schéma de synthèse de la 5- $\delta$ -hydroxybutylhydantoïne.

### Chromatographie en phase gazeuse

Afin d'obtenir des composés volatils, les acides aminés sont transformés en esters butyliques N-trifluoroacétylés en utilisant la méthode de Zumwalt *et al.*<sup>8</sup>. Les acides aminés en suspension dans 100  $\mu$ l de dichlorométhane subissent successivement après évaporation du dichlorométhane, une estérification avec 2 ml de *n*-butanol anhydre saturé en acide chlorhydrique, pendant 2 h à 90°–100° en tubes bouchés. Les réactifs sont évaporés avant de procéder à l'acylation. Les dérivés remis en solution dans 500  $\mu$ l de dichlorométhane sont alors traités par 50  $\mu$ l d'anhydride trifluoroacétique pendant 2 h à 100° en tubes bouchés.

Les chromatographies sont effectuées sur 2  $\mu$ l de cette solution. La séparation a lieu dans un chromatographe Fractovap GV (Erba Sciences) équipé d'une colonne en verre de 2 m  $\times$  3 mm (diamètre intérieur). La colonne est silylée et remplie de Gas-Chrom P, 100–120 mesh (Erba Sciences) imprégné de la phase fixe, SE-30 (méthyl siloxane) 1%–QF-1 (méthyl fluoroalkylsilicone) 3%. Une phase mobile est constituée par un flux d'azote d'un débit de 40 ml/min. Les acides aminés sont élués en fonction de la température qui est programmée de 100° à 250° à raison de 4°/min.

Les produits contenus dans l'effluent gazeux sont détectés par ionisation de flamme. Dans un précédent travail<sup>9</sup> nous avons utilisé cette méthode pour séparer les acides aminés contenus dans des hydrolysats d'échantillon de collagène.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Vérification de la structure des produits obtenus par synthèse

*5- $\delta$ -Hydroxybutylhydantoïne*. Le produit obtenu a un point de fusion de 160° mesuré par analyse thermique différentielle. Son spectre infrarouge permet de caractériser les groupements O–H, C–H, N–H, C=O qui se trouvent dans la molécule de la 5- $\delta$ -hydroxybutylhydantoïne. La courbe d'intégration du spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) précise l'existence de 12 protons: 8 protons aliphatiques, 1 proton de la fonction O–H, 2 protons des groupements N–H et 1 proton du carbone 5 qui correspondent à la structure théorique de la 5- $\delta$ -hydroxybutylhydantoïne.

### *$\epsilon$ -Hydroxynorleucine*

*$\epsilon$ -Hydroxynorleucine*. Le point de fusion du composé se situe environ à 230°. Le produit obtenu est colorable par le ninhydrine alors que la 5- $\delta$ -hydroxybutylhydantoïne ne l'était pas. Son spectre infrarouge est caractéristique d'un acide aminé. Il permet l'identification des bandes d'absorption dues aux groupements: O–H, C–H, N–H, C=O et l'observation des déplacements de la bande C=O vers 1600  $\text{cm}^{-1}$ , déplacement que l'on remarque habituellement dans les spectres infrarouge des acides aminés. Le spectre de RMN dans l'eau lourde permet de confirmer la chaîne aliphatique de cet acide aminé qui comporte 13 protons dont 8 protons aliphatiques. Le spectre de masse de l'ester butylique di-O,N-trifluoroacétylé de l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine montre un pic moléculaire  $m/e = 395$  et les fragmentations caractéristiques de ce composé (Fig. 2).

### Localisation sur les chromatogrammes de l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine

On obtient une bonne séparation des acides aminés caractéristiques du colla-

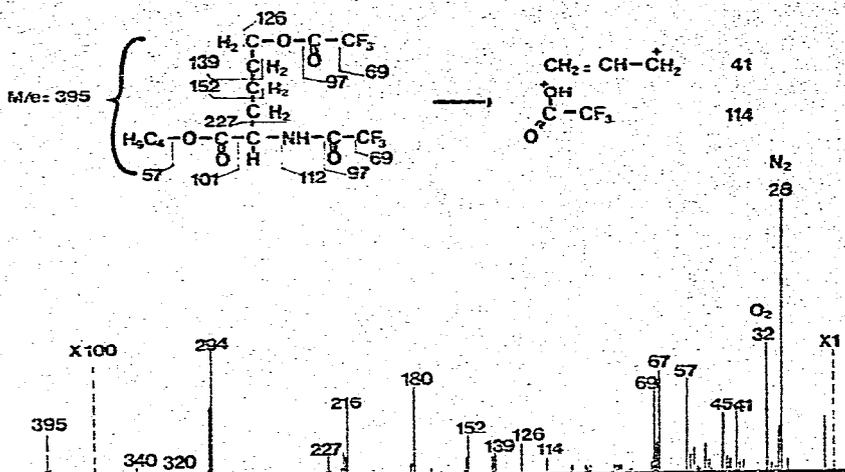


Fig. 2. Spectre de masse de l'ester butylique di-O,N-trifluoroacétylé de l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine.

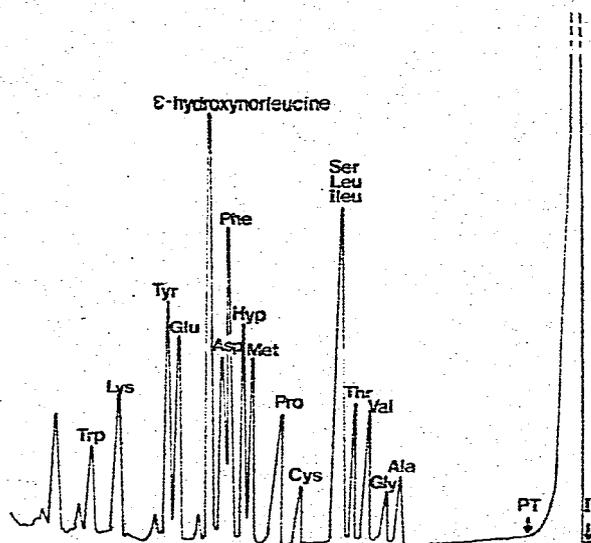


Fig. 3. Chromatographie en phase gazeuse d'un mélange d'acides aminés à raison de 5 nmoles de chacun d'entre eux en solution dans 2  $\mu$ l de dichlorométhane. Phase stationnaire, QF-1 3%-SE-30 1% (60:40); phase mobile, azote, 40 ml/min. Programmation de température, de 100° à 250°, 4°/min.

gène (proline-hydroxyproline) en utilisant un mélange des phases QF-1 3%-SE-30 1% dans un rapport (60:40, p/p).

En comparant les chromatogrammes obtenus avec un mélange d'acides aminés à ceux obtenus après une surcharge en  $\epsilon$ -hydroxynorleucine de synthèse, on observe que l' $\epsilon$ -hydroxynorleucine apparaît sur les chromatogrammes sous forme d'un pic nettement distinct de celui des autres acides aminés et se situant immédiatement après le pic de l'acide aspartique (Fig. 3).

## REMERCIEMENT

Ce travail a bénéficié de l'aide de la D.G.R.S.T. par un contrat No. 74.7.0763 d'action complémentaire coordonnée de Chimie Analytique.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 O. O. Blumenfeld et P. M. Gallop, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 56 (1966) 1260.
- 2 E. Schiffmann et G. R. Martin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 138 (1970) 226.
- 3 A. Deshmukh, K. Deshmukh et M. E. Nimni, *Biochemistry*, 10 (1971) 2337.
- 4 R. C. Page, E. P. Benditt et C. R. Kirkwood, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33 (1968) 752.
- 5 A. J. Bailey et C. M. Peach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33 (1968) 812.
- 6 R. Gaudry, *Canadian J. Res.*, 26B (1948) 387.
- 7 L. E. Schniepp et H. H. Geller, *J. Amer. Chem. Soc.*, 68 (1946) 1646.
- 8 R. W. Zumwalt, D. Roach et C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 171.
- 9 C. Perier, J. Farjanel, M. Therme, M. Brunel et J. Frey, *Biochimie*, 56 (1974) 1003.