

L-lysine ^{14}C et L-histidine ^{14}C Séparation chromatographique préparative sur papier

E. SALA, H. MAIER-HÜSER et P. FROMAGEOT

Service de Biochimie — Département de Biologie — Commissariat à l'Énergie Atomique, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Gif sur Yvette (France)

Reçu le 12 Septembre 1966

SUMMARY

The possible ways for the separation of lysine ^{14}C and histidine ^{14}C by preparative paper and thin-layer chromatography with the published methods, have been critically examined.

A more satisfying technique, consisting in a chromatography on paper Whatman 3 in the following solvent pyridine|n.butanol|water|14 N ammonia (5|3|3|1), is proposed.

30 mg of each amino-acid can be separated.

RÉSUMÉ

On a examiné de façon critique les possibilités de séparation de la lysine ^{14}C et de l'histidine ^{14}C par chromatographie préparative sur papier ou sur couches minces, avec les solvants usuels.

On décrit une technique plus satisfaisante que les méthodes antérieures, qui comporte une chromatographie sur papier Whatman 3 dans le solvant pyridine|n.butanol|eau|ammoniaque 14 N (5|3|3|1).

30 mg de chacun de ces deux amino-acides peuvent être séparés.

INTRODUCTION

Si l'identification de la *l*-lysine et de la *l*-histidine, par chromatographie sur couches minces ou sur papier, a donné lieu à de nombreux travaux, par contre leur séparation chromatographique préparative sur couches minces ou sur papier ne semble pas avoir été étudiée d'une façon particulière.

Signalons toutefois la séparation de la lysine et de l'histidine effectuée par Krishnamurthy et Swaminathan⁽¹⁾, par chromatographie circulaire sur papier, et la séparation obtenue par Stanimir Sibalic et Nada Nadej⁽²⁾ par chromatographie horizontale sur papier, au moyen de phénol saturé de tampon phosphate à pH 6,8 mais il s'agit dans ces cas de très faibles quantités à chromatographier.

TABLEAU I. Valeurs des $R_f \times 100$ fournies par la littérature, établies par chromatographie sur papier ou sur couches minces.

N des solvants	Composition des solvants de développement *	Supports	Mode de Chromatographie	Rf \times 100		Réf. Bibliograph.
				<i>l</i> -lys.	<i>l</i> -hist.	
1	Méthanol à 95%	Whatman 1	ascendant	4	15	4
2	Méthanol/Pyridine/eau (80/4/20)	DEAE cell.	asc.	69	41	5
3	Méthanol/Pyridine/Ac. acétique/eau (8/4/1/20)	DEAE cell.	asc.	60	48	5
4	Méthanol/chloroforme/ammoniaque 10 N (2/2/1)	Silicagel G	asc.	56	48	6
5	Ethanol/eau (63/37) (en poids)	Silicagel G	asc.	3	33	7
6	Ethanol à 95%	Whatman 1	asc.	7	31	4
7	Ethanol/ammoniaque 20N (77/23) (en poids)	Silicagel G	asc.	11	42	7
8	Ethanol/ammoniaque concentrée (95/5)	Whatman 1	asc.	31	36	4
9	Ethanol/ac. acétique (95/5)	Whatman 1	asc.	17	12	4
10	Ethanol/ <i>n</i> .butanol/eau/pipéridine (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	18	26	8
11	Ethanol/ <i>n</i> .butanol/eau/dicyclohexylamine (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	18	41	8
12	Ethanol/ <i>n</i> .butanol/eau/diéthylamine (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	23	34	8
13	Ethanol/ <i>n</i> .butanol/eau/ac. propionique (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	16	15	8
14	Propanol/eau (70/30)	Silicagel G	asc.	2	20	7
15	Propanol/ammoniaque 20N (67/33) (en poids)	Silicagel G	asc.	18	38	7
16	Propanol/ammoniaque 2N (8/2)	DEAE cell.	asc.	11	10	5
17	Propanol/butanone/ eau/dicyclohexylamine (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	16	43	8
18	Isopropanol/pyridine/ eau/ac. acétique (8/8/4/1)	Whatman 4	asc.	14	16	9
19	Isopropanol/ammoniaque 2N (8/2)	DEAE cell.	asc.	11	11	5
20	<i>n</i> .butanol/ac. acétique/ eau (6/2/2) (en poids)	Silicagel G	asc.	5	6	7
21	<i>n</i> .butanol/ac. acétique/ eau (4/1/5) (phase supérieure)	DEAE cell.	asc.	20	22	5
22	<i>n</i> .butanol/ac. acétique/ eau (25/6/25) (phase supérieure)	Whatman 1	asc.	18	19	10

TABLEAU I. (suite)

N° des solvants	Composition des solvants de développement *	Supports	Mode de Chromatograph.	Rf × 100		Réf. Bibliograph.
				<i>l</i> -lys.	<i>l</i> -hist.	
23	<i>n</i> .butanol/ac. acétique/eau (12/3/5)	Whatman 1	asc.	16	17	11
24	<i>n</i> .butanol/acétone/eau/dicyclohexylamine (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	20	48	8
25	<i>n</i> .butanol/méthyléthylcétone/ammoniaque 17N/eau (5/3/1/1)	Whatman 1	asc.	8	24	12
		Whatman 1	asc.	8	13	11
26	<i>n</i> .butanol/ac. formique/eau (60/5/5)	Whatman 1	asc.	27	25	13
27	<i>n</i> .butanol saturé d'ammoniaque 2N	Whatman 1	asc.	2	9	14
28	<i>n</i> .butanol/alcool benzylique (1/1) saturé d'eau	Whatman 1	asc.	1	3	15
29	<i>n</i> .butanol/ethanol/eau (8/2/2)	Whatman 1	asc.	4	8	4
30	<i>n</i> .butanol/butanone/eau (10/10/5)	Whatman 1	asc.	2	5	8
31	<i>n</i> .butanol/butanone/eau/cyclohexylamine (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	8	21	8
32	<i>n</i> .butanol/butanone/eau/dicyclohexylamine (10/10/5/2)	Whatman 1	asc.	4	23	8
33	<i>n</i> .butanol/ethanol à 95% HCl 2N (8/2/4)	Whatman 1	asc.	18	18	4
34	Butanol sec./butanol tert./méthyléthylcétone/eau (1/1/1/1)	DEAE cell.	asc.	6	11	5
35	Butanol sec./ammoniaque 1,7N (5/2)	Whatman 1	asc.	17	25	11
36	Butanol tert./ac. formique/eau (70/1/29)	Schleicher-Schüll n° 589		17	16	16
37	Butanol tert./ac. formique/eau (70/15/15)	Schleicher-Schüll n° 589		12	12	16
38	Alcool amylique tertiaire saturé d'eau	Whatman 1	asc.	2	7	17
39	Méthyléthylcétone/pyridine/ac. acétique/eau (70/15/2/15)	DEAE cell.	asc.	2	4	5
40	Méthyléthylcétone/ac. propionique/eau (15/5/6)	Whatman 1	horizontal	31	34	18
41	Phénol/eau (75/25) (en poids)	Silicagel G	asc.	9	32	7
42	Phénol/eau (10/2) (en poids)	Whatman 1	asc.	81	69	19

TABLEAU I. (suite)

N° des solvants	Composition des solvants de développement *	Supports	Mode de Chromatograph.	Rf × 100		Réf. Bibliograph.
				<i>l</i> -lys.	<i>l</i> -hist.	
43	Phénol/eau (8/2) (en poids)	Whatman 1	descend.	46	66	4
44	Phénol saturé d'eau contenant 6,3% de citrate sodique et 3,7% de phosphate monopotassique	Whatman 1	asc.	39	55	4
45	Phénol à 98%/m.crésol/tampon pH 9,3 (198/165/45)	Whatman 52 tamponné à l'EDTA		12	40	20
46	Phénol/eau (78/22) + traces d'ammoniaque	Schleicher-Schüll N° 589		78	72	16
47	Acide isobutyrique/eau (8/2)	Whatman 1	asc.	12	29	4
48	Pyridine/eau (8/2)	DEAE cell.	asc.	16	21	5
49	Pyridine/eau (65/35)	Whatman 1	asc.	13	47	4
	Pyridine/eau (65/35)	Whatman 1		(non indiqué)	43	21
50	Pyridine/ac.acétique/eau (30/10/7)	DEAE cell.	asc.	18	22	5
51	Pyridine/ac.acétique/eau (50/35/15)	Whatman 1		35	37	22
52	Pyridine/ <i>n</i> .butanol/eau (5/5/2)	Whatman 1	asc.	2	12	4
53	Pyridine/alcool isoamylique/eau (35/30/30)	Whatman 1	descend.	7	14	4
54	Pyridine/alcool isoamylique/eau/diéthylamine (10/10/7/0,3)	Whatman 1	asc.	20	40	23
55	Pyridine/ <i>n</i> .butanol/eau (8/2/2)	Whatman 1	asc.	2	23	4
56	Pyridine/méthanol/eau/ac.acétique (6/6/4/1)	Whatman 4	asc.	49	45	9
57	Lutidine/eau (65/35)	Whatman 1	asc.	2	11	4
58	Lutidine/collidine/eau (1/1/1) + 1% de diéthylamine	Whatman 1	asc.	11	27	24
59	Collidine/eau (125/44)	Whatman 1		14	28	25
60	γ -picoline/eau (6/4)	Whatman 1		14	31	22
61	Acétone/urée/eau (60/0,5/40) (v/p/v)	Whatman 1		25	59	21
62	Formiate d'ammonium 0,05 M tamponné à pH 9	Whatman 1 modifié en succinyl-cellulose.		53	76	26

* La composition des solvants est donnée en volumes, sauf indication contraire.

Le but de notre étude a été de rechercher un procédé permettant de préparer par chromatographie sur papier la lysine ¹⁴C et l'histidine ¹⁴C existant à l'état de mélange dans des proportions variables dans les fractions obtenues par séparation selon Hirs, Moore et Stein (3), d'un hydrolysate de protéines ¹⁴C.

Il nous a paru intéressant, avant d'aborder la description de la partie expérimentale de notre travail, de réunir (tableau I) les indications bibliographiques concernant les Rf de la lysine et de l'histidine, en chromatographie sur papier ou sur couches minces.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Au cours de notre étude, nous avons utilisé soit les chlorhydrates de *l*-lysine et de *l*-histidine inactifs, soit les chlorhydrates de ces deux amino-acides marqués au ¹⁴C, soit enfin un mélange des chlorhydrates inactifs et des chlorhydrates radioactifs, ces derniers servant de « traceurs » radioactifs.

Dans le premier cas, la révélation des substances chromatographiées a été effectuée par pulvérisation sur le chromatogramme d'une solution éthanolique contenant 1% de ninhydrine et 1% de nitrate de cobalt. Ce révélateur est une légère modification de celui préconisé par Przybylska et ses collaborateurs (27), pour rendre les taches d' amino-acides ainsi révélées plus stables à la lumière. Dans les deuxième et troisième cas, une simple autoradiographie effectuée sur les chromatogrammes, nous a permis de repérer les positions des deux bases hexoniques.

Dans la plupart de nos essais, nous avons employé les chlorhydrates dissous dans l'eau distillée ou dans HCl 0,01 N, à la concentration de 10 mg de base par ml, ou même à la concentration de 100 mg de base dans 5 ml de solution, lorsqu'il s'est agi de chromatographier des quantités relativement élevées de ces amino-acides, dans le but de séparation préparative.

Les chiffres indiqués dans les tableaux suivants, relatifs aux poids d' amino-acides, sont rapportés aux poids des bases de ces derniers.

Notre travail a consisté d'abord à chercher si, parmi les systèmes-solvants du tableau I, il s'en trouvait quelques-uns susceptibles de fournir une séparation préparative convenable concernant les deux amino-acides étudiés, soit par chromatographie sur papier, soit par chromatographie sur couches minces.

Si nous faisons abstraction de ceux qui contiennent des sels ou d'autres substances susceptibles de devenir gênantes au cours d'une séparation préparative, ou au cours d'une élution ultérieure des amino-acides soumis à la chromatographie, nous constatons que l'ensemble des solvants indiqués dans le tableau I peut se diviser en trois groupes :

1) *Le groupe des solvants neutres* donne des taches d'identification de la *l*-lysine et de *l*-histidine, en général bien distinctes, tout spécialement pour les solvants n° 1, 5, 6, 14, mais on constate avec eux de fortes élongations et traînées de la lysine et de l'histidine, lorsque les quantités à chromatographier sont supérieures à 10 µg par tache.

2) *Les solvants acides* fournissent des Rf trop voisins pour les deux amino-acides étudiés.

Les solvants faiblement acides, tels que ceux à base de phénol, donnent des Rf bien distincts par chromatographie sur couches minces ou sur papier, quand il s'agit de très faibles quantités de lysine et d'histidine, mais ne conviennent plus à des fins de séparations préparatives, par suite de la formation d'élongations et de traînées.

3) *Ce sont les solvants basiques* qui donnent les meilleures identifications chromatographiques pour les deux amino-acides en question.

Nos essais effectués sur ces solvants nous ont amenés à les diviser en deux catégories :

a) Les mélanges alcooliques alcalins, qui ont tendance à donner, pour la lysine et l'histidine, des traînées, en chromatographie sur papier ou sur couches minces. C'est le cas notamment des solvants n° 7 et 15, expérimentés sur Whatman 3, sur cellulose MN 300 et sur Silicagel G.

Le solvant de cette catégorie qui nous a fourni les meilleurs résultats sur Whatman 3 est le n° 25, à base de butanol, méthyléthylcétone, ammoniacque et eau, mais l'intervalle de séparation préparative des deux bases hexoniques y est trop faible.

b) Les mélanges à base de solvants pyridiniques.

Le tableau II résume les résultats les plus caractéristiques obtenus sur Whatman 3 avec des solvants contenant des méthyl-pyridines par chromatographie descendante.

TABLEAU II. Séparation de la *l*-lysine et de la *l*-histidine sur Whatman 3

Quantités déposées sur 4 cm de longueur : 6 mg de mélange à parties égales en lysine et en histidine. Chromatographie descendante : 17 h à 20°.

Solvants de chromatographie	Rf × 100		Intervalle de séparation (mm)
	<i>l</i> -lysine	<i>l</i> -histidine	
N° 58 Lutidine/collidine/eau (1/1/1) + 1% de diéthylamine	1-14	14,2-25,4	0,6
N° 59 : Collidine/eau (125/44)	1-8	9-18	3,0

On constate que les séparations sont bonnes, mais les intervalles entre les acides aminés sont trop faibles.

Le tableau III mentionne des résultats obtenus avec des solvants contenant de la pyridine.

TABLEAU III. Séparation de la *l*-lysine et de la *l*-histidine sur Whatman 3

Quantités déposées sur 4 cm de longueur : 6 mg de mélange à parties égales en lysine et en histidine. Chromatographie descendante : 17 h à 20°.

Solvants de chromatographie	Rf × 100		Intervalle de séparation (mm)
	<i>l</i> -lysine	<i>l</i> -histidine	
Pyridine/alcool iso amylique/eau/ammoniaque à 25% 30/30/21/2 Lègère modification du solvant N° 54	1-8,8	9,7-16,1	3,6
Pyridine/eau/ammoniaque à 25% 66/10/24 ou 66/24/10 (pratiquement 8/3/1) ou 66/30/4	20-28,7	30,0-37,5	5,2

On constate, comme dans le tableau II, que les séparations sont bonnes mais les intervalles entre les acides aminés sont encore trop faibles.

L'objectif à atteindre étant la séparation de la lysine ¹⁴C et de l'histidine ¹⁴C sans contamination mutuelle, il est nécessaire que l'intervalle séparant les zones correspondant à ces amino-acides, après chromatographie, soit plus étendu. A cet effet, nous avons été amenés à modifier la composition du dernier solvant indiqué dans le tableau III, en remplaçant une partie de la pyridine par un alcool ou une cétone.

C'est ainsi que nous avons expérimenté des solvants tels que :

- pyridine/méthyléthylcétone/eau/ammoniaque 14 N (5/3/3/1)
- pyridine/butanol secondaire/eau/ammoniaque 14 N (5/3/3/1)
- pyridine/*n*.butanol/eau/ammoniaque 14 N (5/3/3/1).

Les deux premiers mélanges ne donnent pas de séparation chromatographique sur Whatman 3, pour des quantités égales à 3 mg pour chacun des deux amino-acides étudiés, déposées sur 4 cm de longueur.

Par contre, le troisième système-solvant nous a donné une bonne résolution des mélanges variés de lysine et d'histidine.

Le tableau IV résume nos résultats.

On peut ainsi conclure : le solvant PBEA permet de séparer sur Whatman 3, par chromatographie ascendante ou par chromatographie descendante, les deux bases hexoniques étudiées. Les intervalles de séparation sont au minimum égaux à 1,5 cm pour une longueur de développement de 38 cm, quels que soient les rapports pondéraux respectifs pour l'histidine et la lysine dans le mélange à séparer (essais 1 à 6). Dans ces conditions, on peut séparer des quantités de

TABLEAU IV. Séparation chromatographique sur Whatman 3

Solvant de développement (solvant PBEA) : pyridine/*n*.butanol/eau/ammoniaque 14N (5/3/3/1). Température et durée de développement : 20°, 17 h. Dépôt des substances sur 4 cm de longueur de Whatman 3, pour chaque essai.

Essai n°	Quantités déposées en mg*		Type de chromato- graphie	Rf × 100 pour		Intervalle de séparation des bandes (mm)
	<i>l</i> -lysine	<i>l</i> -histidine		<i>l</i> -lysine	<i>l</i> -histidine	
1	2	2	descendant	14,5-27,5	33-42	21
2	3	3		14,5-29	33-42	15
3	0,05	2	longueur du	23,7-27,6	35,5-42	30
4	2	0,05	développem.	14,5-27,5	37-39,5	36
5	0,2	2	38 cm	20-25	33-39,5	30
6	2	0,2		13,5-25	32-38	27
	Spot de 10 µg	Spot de 10 µg		22,3	36,8	55
7	3	3	ascendant	1,7-15,3	21,3-39,2	14
8	5	5	longueur du développem. 23,5 cm	1-14	19-37	12

* Les quantités des deux amino-acides sont exprimées en mg de bases anhydres.

l'ordre de 3 mg pour chacun des deux amino-acides déposés sur une longueur de 4 cm de Whatman 3, soit pour une feuille entière des quantités atteignant pratiquement 30 mg de chacune des deux bases hexoniques considérées.

On signalera que l'emploi de papier Schleicher-Schüll n° 2316 lavé à l'acide ne conduit pas à des résultats aussi satisfaisants du fait de la plus grande vitesse d'écoulement du solvant PBEA.

On s'est demandé s'il est possible d'améliorer la séparation des zones correspondant à la lysine et à l'histidine, en effectuant un deuxième développement par le même solvant PBEA, sur le même chromatogramme, après séchage pendant 5 à 6 heures à la température ambiante, dans un courant d'air.

Le tableau V donne les résultats obtenus. Ils sont à comparer avec ceux indiqués dans le tableau IV.

Cette observation d'une meilleure séparation de deux substances, à la suite d'un deuxième développement effectué sur le même chromatogramme est en complet accord avec les remarques faites par des auteurs qui ont employé la technique du « développement multiple » pour la séparation de substances présentant des Rf très voisins (²⁸⁻³⁷).

On soulignera le fait que la séparation chromatographique préparative de la *l*-lysine et de la *l*-histidine sur Whatman 3 par le solvant PBEA, exige que

le mélange initial soit simple, notamment exempt de sels et d'un excès d'acide chlorhydrique. Ces dernières substances, si elles se trouvent en faibles quantités, pourront être facilement éliminées par une chromatographie préalable sur Whatman 3 dans le solvant : *n*.butanol/acide acétique/eau (4/1/5) en volumes (utilisation de la phase supérieure).

TABLEAU V. Séparation chromatographique sur Whatman 3 au cours d'un deuxième développement

Solvant de développement (solvant PBEA) : pyridine/*n*.butanol/eau/ammoniaque 14N (5/3/3/1). Température et durée de développement : 20° pendant 17 h, après séchage du premier chromatogramme 6 h à 20° dans un courant d'air.

Essai n°	Quantités déposées lors de la 1 ^{ère} chromatographie sur 4 cm de longueur de Whatman 3 (mg)			Rf × 100 apparents pour		Intervalle de séparation des bandes (mm)
	<i>l</i> -lysine	<i>l</i> -histidine		<i>l</i> -lysine	<i>l</i> -histidine	
1	2	2	longueur du développem. 43 cm chromatogr. descendante	29,1-41,8	48,9-55,8	30
2	3	3		28,0-43,0	49,0-55,8	26
3	0,05	2		37,2-40,7	50,0-55,8	40
4	2	0,05		29,1-40,7	51,1-53,5	45
5	0,02	2		34,9-40,7	49,0-54,6	36
6	2	0,2		28,0-39,5	50,0-53,5	45
	Spot de 10 µg	Spot de 10 µg		36,0	52,3	70
7	3	3	longueur du développem. 26,5 cm chromatogr. ascendante	5,3-21,1	33,9-47,0	34
8	5	5		3,0-21,0	28,3-46,0	19

Dans ces conditions, le mélange lysine-histidine se trouve très peu déplacé au cours du développement, tandis que les sels et l'acide chlorhydrique sont entraînés par le solvant.

Il apparaît ainsi que la technique du développement multiple est d'application générale.

Appliqué en routine à la préparation de *l*-lysine ¹⁴C et de *l*-histidine ¹⁴C, l'emploi du solvant PBEA permet l'obtention de ces amino-acides à un état de pureté radiochimique supérieur à 99%.

Les figures I et II qui suivent illustrent d'une manière concrète les résultats obtenus au cours d'un premier et d'un deuxième développements, en chromatographie descendante.

FIG. I. — Solvant de développement : Pyridine/*n*.Butanol/eau/Ammoniaque 14 N.
(50/30/30/10) v/v.
Un seul développement sur Whatman 3 à 22°C pendant 17 heures.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>l</i> .Histidine. monochlorhydrate	10 µg	0	10 µg	2 mg	3 mg	2 mg	0,05 mg	2 mg	0,2 mg
<i>l</i> .Lysine. bichlorhydrate	0	10 µg	10 µg	2 mg	3 mg	0,05 mg	2 mg	0,2 mg	2 mg

Les quantités indiquées sont rapportées aux poids d'amino-acides exprimés en bases.
Révélation : Pulvérisation par le Réactif Ninhydrine-nitrate de cobalt.

FIG. II. — Solvant de développement : Pyridine/*n*.Butanol/eau/Ammoniaque 14 N.
(50/30/30/10) v/v.
Deux développements successifs sur Whatman 3 à 22°C pendant 17 heures.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>l</i> .Histidine. monochlorhydrate	10 µg	0	10 µg	2 mg	3 mg	2 mg	0,05 mg	2 mg	0,2 mg
<i>l</i> .Lysine. bichlorhydrate	0	10 µg	10 µg	2 mg	3 mg	0,05 mg	2 mg	0,2 mg	2 mg

Les quantités indiquées sont rapportées aux poids d'amino-acides exprimés en bases.
Révélation : Pulvérisation par le Réactif Ninhydrine-nitrate de cobalt.

FIG. I

FRONT DU SOLVANT

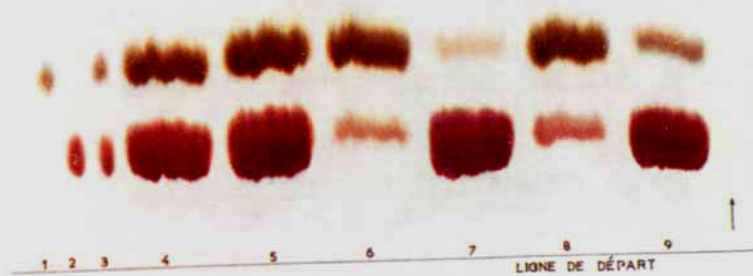


FIG. II

FRONT DU SOLVANT



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KRISHNAMURTHY, K. et SWAMINATHAN, M. — *Science and Culture, (India)*, **20**, 51, (1954).
2. SIBALIC, S. et NADEJ, N.V. — *Anal. Chem.*, **33**, 1223, (1961).
3. HIRS, Ch. W., MOORE, S. et STEIN, W. H. — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6061, (1954).
4. TURBA — *Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie*, Springer Verlag, (1954).
5. LA LLOSA, TERTRIS et JUSTISZ, M. — *J. Chromatog.*, **14**, 134, (1964).
6. FAHMY, A. R., NIEDERWIESER, A., PATAKI, G. et BRENNER, M. — *Helv. Chim. Acta*, **44**, 2022, (1961).
7. BRENNER, M. et NIEDERWIESER, A. — *Experientia*, **16**, 378, (1960).
8. HARDY, T. L. et coll. — *Anal. Chem.*, **27**, 971, (1955).
9. GORDON, H. T., THORNBURG, W. W. et WERUM, G. N. — *J. Chromatog.*, **9**, 44, (1962).
10. WOIWOD, A. J. — *Biochem. J.*, **45**, 412, (1949).
11. WRIGHT, H. E., BURTON, W. W. et BERRY, R. C. — *Arch. Biochim. Biophys.*, **86**, 94, (1960).
12. WOLFE, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 187, (1957).
13. WIGGINS, L. F. et WILLIAMS, J. H. — *Nature*, **170**, 279, (1952).
14. HIRD, F. J. R. et TRIKOJUS, K. M. — *Australian J. Sci.*, **10**, 185, (1948);
FROMAGEOT, C., JUTISZ, M., MEYER, D. et PENASSE, L. — *Biochim. Biophys. Acta*, **6**, 283, (1950);
URBACH, K. F. — *Science*, **109**, 259, (1949);
KOWRABANY, G. N. et coll. — *Anal. Chem.*, **22**, 817, (1950).
15. BLOCK, R. J. et BOLLING, D. — *The Aminoacid Composition of Proteins and Foods*, Springfield, (1951).
16. DUNN, M. S. et MURPHY, E. A. — *Anal. Chem.*, **32**, 461, (1960).
17. MIETTINEN, J. K. — *Luomen Kemiatil*, **2**, 49, (1953).
18. HIMES, J. B. et METCALFE, L. D. — *Anal. Chem.*, **31**, 1102, (1959).
19. CONSDEN, R., CORDON, A. H. et MARTIN, A. J. P. — *Biochem. J.*, **38**, 224, (1944).
20. STEWART, I. — *J. Chromatog.*, **10**, 404, (1963).
21. BENTLEY, H. R. et WHITEHEAD, J. K. — *Biochem. J.*, **46**, 341, (1950).
22. DECKER, P. et RIFFART, W. — *Chem. Zeit.*, **74**, 261, (1950).
23. HEYNS, K. et coll. — *Naturwissenschaften*, **39**, 381, (1952).
24. DENT, C. E. — *Biochem. J.*, **41**, 240, (1947); **43**, 169, (1948).
25. TAUROG, A. et coll. — *J. Biol. Chem.*, **184**, 83, (1950).
26. MICHAEL, F. et LEIFELS, W. — *Chem. Ber.*, **91**, 1212, (1958).
27. PRZYBYLSKA, J. et coll. — *Roczniki Nauk Rolniczyck A*, **79**, 1, (1958) C. A. 53, 11112 i (1959).
28. GIRI, K. V. et RAO, N. A. N. — *Current Sci.*, **20**, 295, (1951).
29. CHU, T. C., GREEN, A. A. et CHU, E. I. — *J. Biol. Chem.*, **190**, 643, (1951).
30. POLLARD, F. W., Mc OMIE et ELBEIH, I. J. M. — *J. Chem. Soc.*, 470, (1951).
31. JEANES, A., WISE, C. S. et DIMLER, R. J. — *Anal. Chem.*, **23**, 415, (1951).
32. SEVERIN, S. E. et FEDOROVA, V. N. — *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.*, **82**, 443, (1952).
33. FRENCH, D. et WILD, G. — *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2612, (1953).
34. KEIL, O. — *Chem. Listy*, **48**, 725, (1954).
35. THOMA, J. A. — *Anal. Chem.*, **35**, 214, (1963).
36. THOMA, J. A. — *J. Chromatog.*, **12**, 441, (1963).
37. HALPAAP, H. — *Chemie, Ing. Techn.*, **35**, n° 7, 488, (1963).