

RECHERCHES SUR L'EMPLOI DE L'HYPPOCHLORITE DE SODIUM DANS LE DOSAGE DE L'ALANINE, LA VALINE ET LES LEUCINES

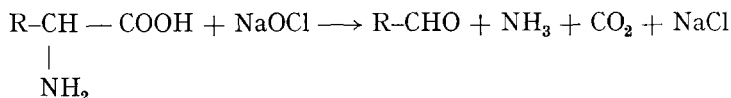
par

E. AUBEL ET J. ASSELINEAU

Institut de Biologie Physico-chimique, Paris (France)

Parmi tous les acides aminés que renferment les protéines, ce sont les acides mono-aminés monocarboxyliques, et en particulier, le groupe alanine, valine, leucines, qui offrent le plus de difficultés à doser. Aussi avons nous pensé qu'il pourrait être utile d'appliquer à leur dosage la réaction de l'hypochlorite de sodium sur les acides aminés.

LANGHELD¹ a montré le premier que l'hypochlorite dégrade les acides aminés en aldéhydes possédant un atome de carbone de moins que l'acide initial, et en ammoniac, selon le schéma global:



Cet auteur avait noté le rendement élevé avec lequel se forment certains de ces aldéhydes.

POLONOWSKI², utilisant l'ammoniac formé au cours de cette réaction, a élaboré un dosage global des acides aminés. Nous nous sommes attachés au contraire, à essayer de doser spécifiquement certains acides aminés à l'aide de l'aldéhyde auquel ils donnent naissance.

Afin de pouvoir recueillir quantitativement les aldéhydes libérés, il importe de les enlever du milieu réactionnel au fur et à mesure de leur formation, soit par un courant d'air, soit par un courant de vapeur d'eau. Parmi les acides aminés naturels, seuls donnent des aldéhydes entraînaibles dans les conditions que nous utilisons:

le glycolle: formaldéhyde,

l'alanine: acétaldéhyde,

la valine: isobutyraldéhyde,

les leucines: isovaléraldéhyde et méthyl-éthyl-acétaldéhyde,

la phénylalanine: phényl-acétaldéhyde,

la méthionine: un produit d'oxydation au soufre du méthyl-thio-propionaldéhyde,

et l'acide aspartique: semi-aldéhyde malonique, décomposé avec formation d'acétaldéhyde.

Nous avons reconnu que des résultats quantitatifs ne pouvaient être obtenus que dans le cas de l'alanine, de la valine et des leucines. Ce sont donc les possibilités de dosage de ces trois amino-acides au moyen de leur réaction avec l'hypochlorite, qui ont formé le sujet de notre travail.

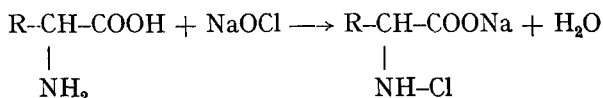
Bibliographie p. 206.

I. DOSAGE DE L'ALANINE, DE LA VALINE ET DE LA LEUCINE, EN SOLUTION PURE

Notre technique comporte deux phases:

a. Transformation de l'acide aminé en acide chloraminé

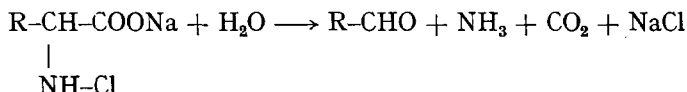
La solution à doser est additionnée d'un léger excès d'une solution d'hypochlorite (de concentration voisine de la normalité), aux environs de 0°, pendant 10 minutes. Il se produit alors la réaction suivante:



L'excès d'hypochlorite est ensuite éliminé en majeure partie par addition d'une solution d'urée à 20 %, en maintenant le contact pendant 10 minutes au bain de glace.

b. Transformation de l'acide chloraminé en aldéhyde en C_{n-1}

Cette réaction est réalisée en faisant tomber goutte à goutte la solution glacée de dérivé chloraminé précédente dans une solution bouillante de tampon de phosphate M/10, de p_H 8.5. La décomposition suivante se produit alors:



L'aldéhyde formé est entraîné au fur et à mesure de sa libération, soit par un courant d'air (en opérant dans l'appareil de LIEB et ZACHERL³, ou dans l'appareil de FUCHS⁴, soit par la vapeur d'eau, dans un petit appareil à distiller rodé, muni d'un entonnoir à robinet (Fig. 1). Par la suite, c'est cette dernière solution que nous avons adoptée, surtout dans le cas de mélanges complexes d'acides aminés. Cette opération s'effectue en 15 minutes environ. L'aldéhyde est recueilli dans une solution de bisulfite de potassium et titré à l'iode de la manière habituelle⁵.

Cette méthode⁶ nous a donné d'excellents résultats en opérant sur des quantités d'acides aminés comprises entre 2 et 20 milligrammes. Voici d'ailleurs quelques exemples:

Solution de 4.45 mg d'alanine dans 30 ml d'eau; chloramination par 0.8 ml d'hypochlorite N/3; puis 1 ml d'urée à 20 %.

Décomposition par 50 ml de tampon de phosphates bouillant.

Consommation de 19.6 ml d'iode N/100, ce qui correspond à 4.36 mg d'alanine, soit 98 % de la théorie.

Solution de 17.8 mg d'alanine dans 30 ml d'eau: chloramination par 1.2 ml d'hypochlorite N/3, et 1 ml d'urée à 20 %.

Bibliographie p. 206.

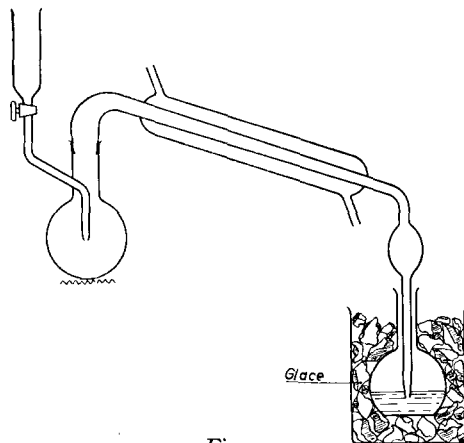


Fig. 1.
Appareil pour la distillation de l'aldéhyde

Consommation de 39 ml d'iode N/100, ce qui correspond à 17.35 mg d'alanine, soit 97.5 % de la théorie.

Solution de 4.68 mg de valine dans 30 ml d'eau:

0.8 ml d'hypochlorite N/3; 1 ml d'urée.

Consommation de 7.75 ml d'iode N/100, ce qui correspond à 4.54 mg de valine, soit 97 % de la théorie.

Solution de 5.24 mg de leucine dans 20 ml d'eau:

0.9 ml d'hypochlorite et 1 ml d'urée à 20 %.

Consommation de 7.85 ml d'iode N/100, soit 5.135 mg de leucine, correspondant à 98 % de la théorie.

Solution de 5.24 mg d'isoleucine dans 30 ml d'eau:

0.9 ml d'hypochlorite et 1 ml d'urée.

Consommation de 7.8 ml d'iode N/100, correspondant à 5.11 mg d'isoleucine, soit 97.5 % de la théorie.

II. DOSAGE DE L'ALANINE DANS UN MÉLANGE QUELCONQUE D'ACIDES AMINÉS

Dans le cas d'un mélange d'alanine, valine, leucines et autres acides aminés à aldéhydes entraînables, le traitement précédent conduit donc à un mélange d'aldéhydes, dont on ne peut doser que la somme par l'iode. Mais grâce à des méthodes de dosage colorimétrique spécifique de l'acétaldéhyde, on peut doser ce dernier seul dans le mélange (dosage colorimétrique de FROMAGEOT et HEITZ⁷ à la pipérazine et au nitroprussiate de sodium; dosage de EEGRIWE⁸ au p-hydroxydiphényle).

Lorsque l'on veut appliquer cette méthode à un mélange quelconque d'acides aminés (hydrolysats protéiques, par exemple), des précautions doivent être prises pour éviter que l'acide aspartique présent ne libère de l'acétaldéhyde, qui viendrait s'ajouter à celui provenant de l'alanine. Le problème peut être pratiquement résolu⁹, soit par addition d'iodomercurate de potassium au tampon de phosphates, soit plus rigoureusement en soumettant la solution à doser à une adsorption préliminaire sur alumine "acide" préparée selon WIELAND¹⁰, qui fixe quantitativement les acides aminés dicarboxyliques.

Nous avons appliqué cette technique à deux hydrolysats protéiques:

Caséine (caséine dégraissée Hoffmann-La Roche): alanine: 3.0 %.

Edestine (Hoffmann-La Roche): alanine: 5.25 %.

Ces résultats concordent avec les récentes données analytiques trouvées dans la littérature (II et I2).

III. DOSAGE SPÉCIFIQUE DE LA VALINE ET DES LEUCINES, DANS UN MÉLANGE DE CES DEUX ACIDES

Une grande difficulté s'est présentée pour doser spécifiquement isobutyraldéhyde et aldéhydes valériques, l'un en présence des autres. Nous avons dû recourir à une méthode de séparation physique, inspirée d'une technique mise au point par MARTIN et SYNGE¹³ pour séparer microquantitativement acétaldéhyde et propionaldéhyde.

Les aldéhydes entraînés par un courant d'air sont reçus dans des absorbeurs garnis de tétrachlorure de carbone, refroidis par un mélange glace-sel. Le tétrachlorure de carbone a un point d'ébullition de 76°, intermédiaire entre celui de l'isobutyraldéhyde

(63°) et celui de l'isovaléraldéhyde (92°); (et du méthyl-éthyl-acétaldéhyde (103°) correspondant à l'isoleucine). Par suite, lorsque la solution tétrachloroformique d'aldéhyde est mise à refluer dans une puissante colonne à fractionner de 1.50 mètre de hauteur, équipée à sa partie supérieure d'un réfrigérant (Fig. 2), l'isobutyraldéhyde se concentre dans la région supérieure de la colonne, tandis que l'isovaléraldéhyde reste dans la zone inférieure. Au moyen d'un courant d'air de vitesse convenablement réglée, l'isobutyraldéhyde est entraîné dans des absorbeurs à bisulfite. L'opération demande environ 1 heure 30. On peut ainsi doser l'isobutyraldéhyde présent dans un mélange d'aldéhydes butyrique et valériques. Malheureusement, malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pu doser l'aldéhyde valérique que par différence, et comme les valeurs obtenues pour l'isobutyraldéhyde sont un peu fortes, (100 à 105 %), les valeurs trouvées pour l'aldéhyde valérique sont un peu faibles (100 à 95 %).

Cette technique, ainsi mise au point sur des mélanges d'aldéhydes, a été appliquée à des mélanges de valine et de leucines.

IV. DOSAGE DE LA VALINE ET DE LA LEUCINE, EN PRÉSENCE D'ALANINE

Le principe du dosage reste le même, mais l'acétaldéhyde fourni par l'alanine au cours du traitement par l'hypochlorite, est retrouvé, après le fractionnement dans le tétrachlorure de carbone, à côté de l'isobutyraldéhyde. Par suite, il est nécessaire de doser colorimétriquement l'acétaldéhyde présent, et de retrancher un volume d'iode correspondant du volume obtenu par titration de la solution bisulfitique, (provenant du fractionnement), pour déterminer la teneur en isobutyraldéhyde, et par suite en valine.

Quant à la leucine, elle est déterminée au cours d'une autre opération, en recueillant directement dans du bisulfite les aldéhydes entraînés par un courant d'air et en dosant par l'iode la somme "acétaldéhyde + isobutyraldéhyde + aldéhydes valériques". La somme des deux premiers aldéhydes ayant été déterminée comme il a été dit, on en déduit par différence la teneur en aldéhydes valériques, donc en leucine.

Exemple

Solution renfermant 3.56 mg d'alanine, 4.68 mg de valine et 10.44 mg de leucine dans 20 ml.

a. Dosage de la valine

La solution est chloraminée par 1 ml d'hypochlorite N/3, puis 1 ml d'urée à 20 %. La décomposition est effectuée en recueillant les aldéhydes dans du tétrachlorure de

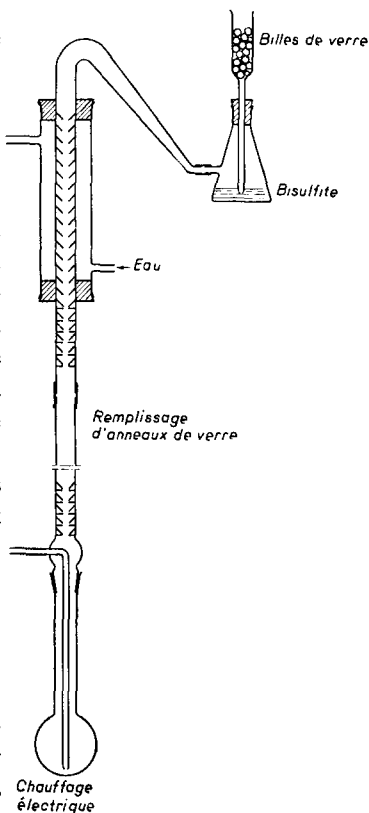


Fig. 2. Appareil pour la séparation de l'isobutyraldéhyde et l'isovaléraldéhyde

carbone (appareil de Fuchs). La solution de CCl_4 est fractionnée comme il a été dit, pendant 1 heure 30. Les aldéhydes volatiles sont captés dans du bisulfite.

Titrage à l'iode: consommation de 14.8 ml iode N/100.

Dosage colorimétrique de l'acétaldéhyde: trouvé 1.45 mg d'acétaldéhyde, ce qui correspond à une consommation de 6.5 ml d'iode N/100.

D'où, butyraldéhyde: $14.8 - 6.5 = 8.3$ ml iode, ce qui correspond à 4.68 mg de valine, soit 104 % de la quantité utilisée.

b. Dosage de la leucine

Sur une seconde prise de solution, de composition identique, un traitement similaire par l'hypochlorite est effectué, mais les aldéhydes entraînés (acétaldéhyde + butyraldéhyde + valéraldéhyde), sont reçus directement dans du bisulfite.

Cette solution est titrée à l'iode: consommation de 31.3 ml d'iode N/100.

Dosage colorimétrique de l'acétaldéhyde: trouvé 1.775 mg d'acétaldéhyde, ce qui correspond à 3.58 mg d'alanine (soit 100.8 %); il lui est donc attribuable une consommation de 8.06 ml iode N/100.

Compte tenu de la consommation d'iode trouvée précédemment pour le butyraldéhyde (8.3 ml), il est donc attribuable au valéraldéhyde: $31.3 - (8.3 + 8.06) = 14.9$ ml iode N/100; ce qui correspond à 9.71 mg de leucine, soit 93.2 %.

Ces deux opérations peuvent être effectuées simultanément et demandent environ 4 heures.

Voici quelques résultats obtenus:

Quantités utilisées en mg			Quantités dosées en mg					
Alanine	Valine	Leucine	Alanine	Erreur	Valine	Erreur	Leucine	Erreur
Omg	11.7	13.1	0	—	12.1	+ 3.9 %	12.05	— 8 %
3.56	0	10.44	3.73	+ 5 %	1.05	—	8.87	— 15 %
3.56	7.02	0	3.53	— 0.6 %	6.48	— 7.6 %	0.51	—
8.9	11.7	13.1	9.4	+ 6 %	11.99	+ 2.5 %	11.26	— 14 %
3.56	4.68	5.22	3.48	— 2 %	4.61	— 1.5 %	4.94	— 1.5 %
3.56	4.68	10.44	3.58	+ 0.8 %	4.86	+ 4 %	9.71	— 8 %
3.56	9.36	5.22	3.57	+ 0.5 %	9.18	— 1.9 %	5.06	— 3 %
3.56	7.02	10.44	3.38	— 4.5 %	7.30	+ 4 %	10.23	— 2 %
7.12	4.68	5.22	6.97	— 2 %	4.27	— 9 %	5.57	+ 6.7 %

V. DOSAGE DE LA VALINE DANS DES MÉLANGES COMPLEXES D'ACIDES AMINÉS (HYDROLYSATS PROTÉIQUES)

En appliquant la technique sous la forme qui vient d'être exposée (les aldéhydes étant entraînés par un *courant d'air*), à un hydrolysats de protéine, nous avons obtenu des valeurs trop faibles pour la valine et pour la leucine. Pour réaliser dans un milieu aussi complexe l'entraînement quantitatif des aldéhydes, nous avons dû recourir à l'entraînement par la vapeur d'eau (en se servant de l'appareil de la Fig. 1).

Dans ces conditions, les aldéhydes libérés par le glycolle, la phénylalanine, et la méthionine sont aussi entraînés et empêchent le dosage par différence de la leucine. C'est pourquoi le dosage de ce dernier amino-acide sera étudié à part.

Pour doser la valine, nous effectuons donc la décomposition des dérivés chloraminés

dans 60 ml de tampon de phosphates M/10 (p_H 8.5) en utilisant l'appareil de la Fig. 1. L'extrémité du réfrigérant plonge dans 10 ml d'eau glacée (refroidie par un bain de glace) et contenus dans le ballon rodé de l'appareil de FUCHS. L'introduction de la solution et la distillation sont effectuées en 15 à 20 minutes. Le ballon récepteur est alors rapidement monté sur l'appareil de FUCHS, dont les absorbeurs sont remplis de CCl_4 refroidi par un mélange glace-sel. La solution est portée à ébullition, en maintenant à travers tout l'appareil un courant d'air de vitesse convenable (500 ml/min environ). Cette opération dure 15 minutes (à partir de l'ébullition). La solution de tétrachlorure de carbone obtenue est ensuite fractionnée comme il a été indiqué, dans l'appareil de la Fig. 2 pendant 1 heure 30.

Le mélange d'isobutyraldéhyde et d'acétaldéhyde* est titré à l'iode. Puis, l'acétaldéhyde présent est dosé colorimétriquement suivant FROMAGEOT et HEITZ⁷. On en déduit par différence la quantité d'isobutyraldéhyde, et par suite de valine.

Cette méthode a été appliquée à deux protéines:

Caséine (caséine dégraissée Hoffmann-La Roche: valine): 6.1 %.

Les valeurs trouvées dans la littérature sont 6.7 et 6.25 % par voie microbiologique¹⁵, et 6.02 % par chromatographie de partage¹².

Edestine (édestine Hoffmann-La Roche): valine: 5.26 %.

Par voie microbiologique, il a été trouvé 5.1 %, et par chromatographie 4.75 %^{12, 15}.

VI. DOSAGE DE LA LEUCINE DANS UN MÉLANGE COMPLEXE D'ACIDES AMINÉS

Nous rappelons d'abord que dans tout ce travail, nous désignons par leucine l'ensemble "leucine + isoleucine" (et même éventuellement norleucine), qui ne peut être dosé qu'en bloc par cette méthode.

La teneur en aldéhyde valérique correspondant à la leucine, est déterminée au moyen de la différence du volume d'iode utilisé lors du titrage de la somme des aldéhydes présents (acétaldéhyde, isobutyraldéhyde, et aldéhydes valériques), et du volume d'iode calculé correspondant à l'ensemble acétaldéhyde + isobutyraldéhyde. Cette méthode n'est donc plus directement employable lorsque, à côté des aldéhydes énumérés se trouvent du formaldéhyde (glycoçolle), du phényl-acétaldéhyde (phénylalanine), et un aldéhyde dérivé du méthyl-thio-propionaldéhyde (méthionine).

Or, le formaldéhyde peut être retenu dans le ballon à distillation par addition d'asparagine au tampon de phosphates selon les indications de PEYNAUD¹⁶.

Pour éliminer le phényl-acétaldéhyde et l'aldéhyde libéré par la méthionine, nous avons dû recourir à la chromatographie de la solution à doser, sur une colonne de sulfure d'argent activé selon HAMOIR¹⁷. L'inconvénient de ce procédé réside dans la faible capacité d'adsorption du sulfure d'argent, de sorte que pour ménager cette dernière, nous commençons par éliminer les acides aminés dicarboxyliques par passage sur alumine "acide"¹⁰. Pour plus de détails, nous renvoyons à un mémoire publié à ce sujet¹⁸.

* Il est à remarquer que le formaldéhyde produit par le glycoçolle ne gêne pas, n'étant pas entraîné par un courant d'air. Ceci forme d'ailleurs le principe de la séparation de l'acétaldéhyde et du formaldéhyde utilisée par SHINN ET NICOLET¹⁴, dans le dosage de la sérine et de la thréonine.

Bibliographie p. 206.

Exemple

Soient deux solutions renfermant chacune, dans 20 ml d'eau:

3.0 mg de glyocolle	5.32 mg d'acide aspartique
3.56 mg d'alanine	3.3 mg de phényl-alanine
4.68 mg de valine	5.96 mg de méthionine
5.24 mg de leucine	

a. Sur une solution est effectué un dosage de valine comme il vient d'être indiqué. Ce dosage attribue à l'isobutyraldéhyde une consommation d'iode de 8.4 ml (N/100).

b. La seconde solution, neutre, est passée sur une colonne de 5 g d'alumine acide. Le filtrat et les eaux de lavage sont concentrés sous vide; le p_H est amené à 6.5-6.8 (commencement de virage au violet du pourpre de bromo-crésol) et la solution est passée sur une colonne de sulfure d'argent activé* (préparé à partir de 50 g de nitrate d'argent).

Le filtrat et les eaux de lavage sont alors traités par l'hypochlorite, comme il vient d'être dit, et le distillat reçu dans du bisulfite. Un titrage à l'iode donne une consommation de 23.7 ml d'iode N/100. Par dosage colorimétrique, il est calculé pour l'acétaldéhyde présente, une consommation de 8.16 ml d'iode N/100.

Par suite, l'iode attribuable à l'aldéhyde valérique, et donc à la leucine, s'élève à:

$$23.7 - (8.16 + 8.4) = 7.14 \text{ ml iode N/100,}$$

ce qui correspond à 4.67 mg de leucine, soit 90% de la quantité présente (chiffres moyens).

Cette méthode, que nous n'avons pas appliquée à un hydrolysats protéique, implique donc une erreur moyenne de 10 % par défaut.

CONCLUSIONS

La technique que nous exposons dans le présent travail permet donc de déterminer la teneur de protéines en alanine et en valine avec une erreur moyenne de 5 %, en opérant pour chaque essai sur 50 mg environ de protéine (dans le cas de teneur moyenne en ces deux acides aminés). L'emploi de cette technique est plus laborieux et moins précis en ce qui concerne la leucine, que l'on ne peut doser que sous la forme leucine + isoleucine. En outre, dans le cas que nous n'avons pas étudié, de protéines très riches en leucine, (kératine, zéine . . .), il est vraisemblable que le dosage de la valine doit être précédé de l'élimination de la majeure partie de la leucine, comme ceci a été trouvé être indispensable par ROCHE et MOURGUE¹⁹, au cours de dosages de valine et leucine par la méthode de FROMAGEOT et HEITZ²⁰. La leucine est alors séparée de la valine, grâce à l'insolubilité de son sel de cuivre (méthode de BRAZIER²¹).

Dans le cas de l'alanine, le dosage par l'hypochlorite fournit des résultats comparables à ceux donnés par la méthode classique de désamination et oxydation permanganique⁷, tout en apportant une simplification du mode opératoire. La méthode de dosage par la ninhydrine²² conduit à des résultats semblables, plus simplement et avec plus de sécurité (par suite de l'action plus douce et plus spécifique de la ninhydrine), mais présente l'inconvénient grave de la rareté et du prix élevé de ce réactif.

En ce qui concerne la valine et la leucine, le dosage par voie chimique se limite à

* Afin d'avoir une capacité d'adsorption maxima du sulfure d'argent, nous préférons le changer à chaque opération. Il peut être récupéré par transformation en nitrate; par action d'acide nitrique bouillant au 1/3, avec un rendement d'environ 80 %.

la méthode de FROMAGEOT et HEITZ²⁰, modifiée par BLOCK²³. Dans le cas de la valine, le dosage par l'hypochlorite semble présenter un mode opératoire plus simple. Cependant, il est à noter que le dosage de la valine dans des mélanges d'acides aminés renfermant de l'alanine, nécessite la présence d'une quantité minima d'alanine de 2 à 3 mg, car le dosage colorimétrique d'acétaldéhyde qui doit avoir lieu, nécessite l'emploi de la méthode de FROMAGEOT et HEITZ⁷, en raison de la saturation de la solution par le CCl_4 utilisé pour le fractionnement (et écarte la possibilité d'emploi du p-hydroxydiphényle, beaucoup plus sensible). Dans le cas de protéines, il en résulte donc l'obligation d'effectuer le dosage de la valine par l'hypochlorite, sur une quantité d'hydrolysât correspondant au moins à une cinquantaine de milligrammes de protéines.

La valine et la leucine peuvent aussi être dosées par la ninhydrine²², mais dans le cas d'un mélange de ces deux acides aminés, on ne peut obtenir que la valeur de leur somme. La technique de fractionnement des aldéhydes que nous avons indiquée pourrait aussi être employée dans ce cas, avec la restriction que nous venons de mentionner.

Depuis quelques années, les méthodes de dosage par voie chimique de ces amino-acides, ont été dépassées par des méthodes beaucoup plus sensibles et plus précises: les méthodes microbiologiques (revue d'ensemble: 24). Mais, en raison même de leur nature et de l'approvisionnement en souches de micro-organismes convenables, de telles méthodes ne sont pas employables dans tous les laboratoires. En outre, elles font intervenir la configuration stérique de l'acide aminé, ce qui peut être avantageux, mais ce qui occasionne aussi des difficultés supplémentaires, notamment en ce qui concerne les risques de racémisation.

La méthode de chromatographie de partage, mise au point par MARTIN et SYNGE¹² permet aussi de doser l'alanine, la valine et l'ensemble leucine-isoleucine, sur quelques milligrammes d'acides aminés, avec une erreur de moins de 5 %²⁵. Mais la technique en est assez délicate et demande un certain apprentissage.

Aussi pensons nous que la méthode de dosage par l'hypochlorite de l'alanine, de la valine et même de la leucine, exposée ci-dessus, est susceptible de pouvoir rendre quelques services.

RÉSUMÉ

Le dosage de l'alanine, de la valine et de la leucine peut se faire par transformation de chacun des acides aminés en les aldéhydes correspondants, sous l'action de l'hypochlorite de sodium. L'aldéhyde formé est entraîné par la vapeur d'eau ou par un courant d'air, et recueilli dans du bisulfite. Le dosage de l'alanine se ramène ainsi au dosage de l'acétaldéhyde; celui-ci est spécifique si l'on a eu soin d'éliminer préalablement l'acide aspartique du milieu réactionnel, et si on dose l'aldéhyde formé soit par le nitroprussiate et la pipérazine, soit par le p-hydroxydiphényle. La séparation des aldéhydes correspondant à la valine et à la leucine se fait par entraînement et distillation fractionnée, en présence de tétrachlorure de carbone, dans une colonne suffisamment puissante. Dans ces conditions, il est possible de doser dans un mélange d'acides aminés quelconques, et séparément, l'alanine, la valine et l'ensemble des leucines. La précision des résultats obtenus est de l'ordre de 5 %.

SUMMARY

The estimation of alanine, valine and leucine can be carried out by transforming each of these amino acids into the corresponding aldehyde by the action of sodium hypochlorite. The aldehyde so formed is removed by steam or a stream of air and collected in bisulphite. The estimation of alanine is thus reduced to the estimation of acetaldehyde; and it is specific if care is taken to remove aspartic acid from the reaction mixture, and if the aldehyde is estimated either by nitroprusside and piperazine or by p-hydroxydiphenyl. The separation of the aldehydes corresponding to valine and leucine is carried out after removal by fractional distillation, in the presence of carbon tetrachloride, in a

sufficiently powerful column. Under these conditions it is possible to estimate in any mixture of amino acids, and separately, alanine, valine and the leucine group. The accuracy of the results is of the order of 5%.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung von Alanin, Valin und Leucin kann durch Umsetzung dieser Aminosäuren in die entsprechenden Aldehyde durch Einwirkung von Natriumhypochlorit geschehen. Das gebildete Aldehyd wird mit Wasserdampf oder Luftstrom mitgeführt und in Bisulfit aufgefangen. Die Bestimmung von Alanin wird also auf eine Azetaldehydbestimmung reduziert. Diese ist spezifisch, wenn man dafür sorgt, dass erst die Asparaginsäure aus dem Reaktionsmilieu entfernt wird, und wenn man das gebildete Aldehyd entweder mit Nitroprussiat und Piperazin oder mit p-Hydroxydiphenyl bestimmt. Die Trennung der Aldehyde, die Valin und Leucin entsprechen, geschieht durch Mitführung und fraktionierte Destillation bei Anwesenheit von Tetrachlorkohlenstoff und in einer genügend kräftigen Kolonne. Unter diesen Umständen ist es möglich in einem Gemisch von irgendwelchen Aminosäuren und getrennt Alanin, Valin und das Leucingemisch zu bestimmen. Die Genauigkeit der erhaltenen Resultate ist von der Grössenordnung von 5%.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ LANGHELD, *Ber.*, 42 (1909) 2360.
- ² M. POLONOWSKI, *C. R. chim., biol.*, 19 (1937) 773.
- ³ H. LIEB ET M. ZACHERL, *Z. physiol. Chem.*, 211 (1932) 211.
- ⁴ H. FUCHS, *Z. physiol. Chem.*, 221 (1933) 271.
- ⁵ JAULMES ET ESPEZEL, *Ann. Falsif. Fraudes*, 28 (1935) 325.
- ⁶ E. AUBEL ET J. ASSELINEAU, *Bull. Soc. Chim.*, 41 (1947) 114.
- ⁷ C. FROMAGEOT ET P. HEITZ, *Microchimica Acta*, 3 (1938) 52.
- ⁸ E. EEGRIWE, *Z. Anal. Chem.*, 89 (1932) 121.
- ⁹ E. AUBEL ET J. ASSELINEAU, *Bull. Soc. Chim.*, 41 (1947) 689.
- ¹⁰ T. WIELAND, *Ber.*, 75 B (1942) 1001.
- ¹¹ P. DESNUELLE, *Enzymologia*, 5 (1938) 37.
- ¹² A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1358.
- ¹³ A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 294.
- ¹⁴ L. A. SHINN ET B. NICOLET, *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 91.
- ¹⁵ J. R. MACMAHAN ET E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 83.
- K. A. KUIKEN, W. H. NORMAN, F. HALE, C. M. LYMAN ET L. BLOTTER, *J. Biol. Chem.*, 151 (1943) 615.
- ¹⁶ E. PEYNAUD, *Bull. Soc. Chim.*, 40 (1946) 685.
- ¹⁷ G. HAMOIR, *Biochem. J.*, 39 (1945) 485.
- ¹⁸ J. ASSELINEAU, *Bull. Soc. Chim.*, 41 (1947) 1065.
- ¹⁹ J. ROCHE ET M. MOURGUE, *C. R. Soc. Biol.*, 137 (1943) 766.
- M. MOURGUE, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 25 (1943) 1343.
- ²⁰ C. FROMAGEOT ET P. HEITZ, *Enzymologia*, 6 (1939) 258.
- ²¹ M. A. BRAZIER, *Biochem. J.*, 24 (1930) 1188.
- ²² A. VIRTANEN, T. LAINE ET T. TOIVENEN, *Z. physiol. Chem.*, 266 (1940) 193.
- A. VIRTANEN ET N. RAUTANEN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 101.
- ²³ R. J. BLOCK ET D. BOLLING, *The Amino-acid composition of Proteins and Foods* (1945) 224.
- ²⁴ E. E. SNELL, *Advances in Protein Chemistry*, 2 (1945) 85.
- ²⁵ G. R. TRISTRAM, *Biochem. J.*, 40 (1946) 721.

Reçu le 13 mars 1948