

## SÉPARATIONS CHROMATOGRAPHIQUES D'ACIDES AMINÉS ET DE PEPTIDES

### IV. SÉPARATION EN QUATRE GROUPES\*

par

CL. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

Dans les premières communications de cette série<sup>1, 2, 3</sup> ont été décrites différentes séparations chromatographiques de peptides synthétiques; certaines de ces séparations (adsorption sur alumine acide de peptides neutres dans le formol à 10% et de glycyl-peptides dans le formol à 1%) sont nouvelles; les autres constituent l'application à des peptides simples de méthodes ayant servi déjà à la séparation d'acides aminés. C'est ainsi que nous avons montré que les peptides contenant au moins un acide aminé aromatique sont adsorbés spécifiquement sur une colonne de charbon, comme les acides aminés aromatiques libres<sup>4, 5, 6</sup> et que les peptides contenant un acide aminé dicarboxylique sont adsorbés sur alumine acide, comme les acides aminés dicarboxyliques libres<sup>7, 8</sup>.

Dans le but d'étudier la composition d'hydrolysats partiels de protéines, nous avons cherché à mettre au point une méthode de séparation chromatographique des peptides, en peptides basiques, peptides acides et peptides neutres, cette méthode devant être rapide, simple et quantitative, et applicable aussi bien à la séparation des acides aminés libres qu'à celle des peptides.

L'intérêt d'une telle méthode est souligné par les observations de TRISTRAM<sup>9</sup>, d'après lequel "a further improvement might be effected, if the method (il s'agit de la chromatographie de partage des acides aminés neutres) could be used in conjunction with a procedure . . . which would yield the monoaminoacids quantitatively and relatively free from other aminoacids"; par le travail de SPERBER<sup>10</sup> qui propose une technique combinant l'adsorption et l'ionophorèse, et par la communication de TISELIUS, DRAKE ET HAGDAHL<sup>11</sup> concernant la séparation par groupes des acides aminés libres par adsorption.

Un essai préliminaire<sup>3</sup> avait déjà montré que l'alumine acide est un bon adsorbant des peptides acides; il restait donc à choisir un adsorbant convenable des peptides (et des acides aminés) basiques. En outre, on pouvait prévoir que l'adsorption par le charbon pourrait permettre de séparer les peptides et les acides aminés neutres en dérivés cycliques, d'une part, et dérivés aliphatiques, d'autre part.

En ce qui concerne la séparation en groupes des acides aminés libres, rappelons que SCHRAMM ET PRIMOSIGH<sup>12</sup> ont réussi les séparations suivantes: adsorption des acides aminés aromatiques sur charbon, des bases hexoniques sur gel de silice "Merck", des acides aminés dicarboxyliques sur alumine acide, et, finalement, des acides aminés neutres en deux groupes grâce à une adsorption sélective sur alumine acide dans le formol à 10%.

\* Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication préliminaire au XIe Congrès International de Chimie pure et appliquée, Londres 1947.

C'est également le gel de silice que nous avons choisi ici pour l'adsorption des bases hexoniques. Tenant essentiellement à mettre en œuvre un adsorbant facile à préparer et utilisable dans tous les laboratoires, nous nous sommes adressés à un gel de silice préparé d'abord selon GORDON, MARTIN ET SYNGE<sup>13</sup>, puis soumis à un traitement supplémentaire à l'acide chlorhydrique. Il convient de souligner ici la différence fondamentale qui existe entre l'utilisation d'un tel gel de silice dans le présent travail, et l'utilisation qui en a été faite par les auteurs anglais. Ces derniers ont employé ce gel comme support de la phase aqueuse dans la chromatographie de partage concernant les acides aminés acétylés, support ne devant présenter, vis-à-vis de ceux-ci, aucun pouvoir d'adsorption<sup>9</sup>. Dans le présent travail, au contraire, ce gel est destiné à l'adsorption des acides aminés basiques ou des peptides contenant ces acides aminés basiques, pour lesquels il n'est pas question d'acétylation. En fait, nous constatons ici que ce gel\*, utilisé dans des conditions bien déterminées, est un adsorbant très convenable de ces substances.

Des adsorbants autres que le gel de silice ont déjà été utilisés pour la séparation des bases hexoniques : c'est ainsi que WIELAND<sup>16</sup> adsorbe l'arginine et la lysine sur "alumine basique", mais ne peut ainsi fixer l'histidine, et que WIELAND également<sup>17</sup> adsorbe les trois bases hexoniques sur la "Wofatite C", comme le font plus tard TISELIUS, DRAKE ET HAGDAHL<sup>11</sup>, ces derniers auteurs utilisant en outre la "Wofatite K S" pour adsorber les autres acides aminés. Enfin, BERGDOLL ET DORY<sup>18</sup> ont montré récemment que le "Lloyd's reagent" (terre à foulon) est un bon adsorbant spécifique des bases hexoniques, et permet même leur élution différentielle.

S'appuyant sur les considérations précédentes, le présent travail comporte :

En premier lieu, une mise au point de la séparation quantitative des acides aminés et de peptides en les quatre groupes suivants :

- I. Dérivés basiques, adsorbés sur gel de silice;
- II. Dérivés acides, adsorbés sur alumine "acide";
- III. Dérivés neutres aromatiques adsorbés sur charbon;
- IV. Dérivés neutres non aromatiques restant dans le filtrat final.

En second lieu, une application des techniques ainsi mises au point à l'étude des acides aminés provenant de l'hydrolyse totale de l'*insuline*, cette application constituant une vérification indispensable de la validité de l'ensemble des méthodes en question.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### I. SÉPARATION EN GROUPES DES ACIDES AMINÉS ET PEPTIDES

#### *A. Adsorption d'acides aminés basiques et de peptides basiques sur gel de silice*

##### *Préparation de l'adsorbant*

Le gel de silice préparé d'après GORDON, MARTIN ET SYNGE<sup>13</sup> contient des quantités d'azote non négligeables (environ 100 µg/g). L'élimination de la majeure partie des impuretés azotées se fait de la façon suivante : 100 g du gel de silice en question sont traités pendant 50 heures environ par 500 ml d'acide acétique à 20% ; on les recueille ensuite sur Büchner, puis on les remet en suspension dans de l'eau bouillante, et on lave par décantations et mises en suspension successives jusqu'à ce que le liquide surnageant soit à pH 6. Au cours de ce lavage, on élimine les particules de silice restant

\* Le chauffage de ce gel à 250°, d'après HARRIS ET WICK<sup>14</sup> diminue toutefois légèrement ses propriétés adsorbantes. Nous n'avons pas essayé le gel de silice préparé d'après ISHERWOOD<sup>15</sup>.

en suspension après un repos d'une minute; si cette élimination n'avait pas lieu, les colonnes de silice seraient insuffisamment perméables. Après ce lavage, le gel de silice est séché à l'étuve à 110° pendant six heures. Le gel ainsi obtenu est un bon adsorbant, mais il contient souvent encore un peu d'azote (environ 20 µg/g). Le traitement de ce gel, en colonne, par l'acide chlorhydrique dilué, tel qu'il est indiqué ci-dessous, permet de se débarrasser de toute trace d'azote.

#### *Adsorption des bases hexoniques et des peptides basiques*

On prépare une colonne du gel de silice précédent; cette colonne doit correspondre à 35 g de silice avec un diamètre de 25 mm lorsque la solution des acides aminés contient du chlorure de lithium, et à 6 g de silice avec un diamètre de 18 mm lorsque la solution des acides aminés ne contient aucun sel (voir p. 493). Cette colonne est tout d'abord lavée soit par 200 ml d'acide chlorhydrique 0.1 N, puis par 200 ml d'eau (cas d'une colonne de 35 g), soit par 50 ml d'acide chlorhydrique 0.1 N, puis par 100 ml d'eau (cas d'une colonne de 6 g); de toute façon, le  $p_{\text{H}}$  des dernières gouttes de l'eau de lavage doit être compris entre 5.5 et 6.0. On verse ensuite sur la colonne 20 ml d'une solution neutralisée ( $p_{\text{H}} 7$ ) contenant environ 20 mg des bases hexoniques ou de peptides basiques. Si les acides aminés ou les peptides en question, provenant de l'hydrolysat de protéine, existent sous forme de chlorhydrates, l'ajustement de leur solution à  $p_{\text{H}} 7$  doit être fait par l'hydroxyde de lithium et non pas par la soude, (voir p. 493). On lave ensuite la colonne par 250 ml d'eau, ce qui fait passer quantitativement les substances acides et neutres dans le filtrat. L'élation des bases adsorbées se fait quantitativement par lavage de la colonne avec 200 ml d'acide chlorhydrique 0.1 N. Le dosage de l'histidine et de l'arginine peut se faire directement dans la liqueur d'élation.

Nous avons traité comme il vient d'être dit tout une série de solutions, contenant les unes uniquement des bases hexoniques ou des peptides basiques, les autres des mélanges de bases hexoniques et d'acides aminés dicarboxyliques, les autres enfin des mélanges d'acides aminés neutres et acides. Parmi ces dernières solutions, l'une (essai 5) renferme les acides aminés neutres et acides correspondant à la partie neutre et acide d'un hydrolysat synthétique de 100 mg d'insuline, d'après TRISTRAM<sup>9</sup>, à savoir, en mg: glycocolle 4.3; alanine 4.6; sérine 5.2; cystine 12.5; thréonine 2.1; valine 7.5; leucine 10.9; isoleucine 4.8; proline 2.6; phénylalanine 8.1; tyrosine 13.1; acide aspartique 5.7; acide glutamique 18.6. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau I.

Les chiffres du Tableau I montrent que: 1. les trois bases hexoniques, adsorbées sélectivement, sont quantitativement récupérées dans l'éluat; 2. les acides aminés acides ou neutres traversent la colonne sans aucune rétention.

#### *B. Adsorption d'acides aminés dicarboxyliques et de peptides acides sur alumine acide*

##### *Préparation de l'adsorbant*

Nous avons constaté que l'alumine préparée d'après WIELAND<sup>7</sup> contient encore un peu d'azote dont la plus grande partie est entraînée ultérieurement au cours de l'élation par l'acide chlorhydrique 2 N à chaud. Pour obtenir de l'alumine exempte d'azote, nous avons modifié la méthode de WIELAND de la façon suivante: 250 g d'alumine "Prolabo" sont traités par 1250 ml d'acide chlorhydrique 2 N, à l'ébullition, pendant 20 minutes, en agitant. On verse ensuite dans une colonne de 7 cm de diamètre intérieur, puis on traite par 1250 ml d'acide chlorhydrique 2 N bouillant. On transvase

TABLEAU I  
ADSORPTION SUR GEL DE SILICE

La récupération des substances est exprimée en azote pour 100 de l'azote de la substance initiale

No des essais	Substances non adsorbées	N % dans le filtrat	Substances adsorbées	N % dans l'éluat
<b>A. Solutions ne contenant que des acides aminés appartenant à un même groupe</b>				
1	—	0	Arginine 12.8 mg . . . . .	97
2	—	0	Lysine, 2 HCl 6.05 mg . . .	99
3	—	0	Histidine, HCl 19 mg . . . .	102
4	—	2.1*	Arginine 2.95 mg + Lysine 2 HCl 3.70 mg + Histidine HCl 6.05 mg	97
5	Partie acide + neutre d'un hydrolysat synthétique de 100 mg d'insuline . . . . .	99		
6	—	1.8*	Carnosine . . . . .	0.8
<b>B. Solution contenant des acides aminés appartenant à des groupes différents</b>				
7	Ac. glutamique 20 mg . . .	97	Arginine 10 mg . . . . . Histidine HCl, 10 mg . . .	98

\* Dû à des impuretés non basiques

\*\* Correspondant à la partie basique de 100 mg d'insuline

ensuite dans un erlenmeyer, puis on lave 4 à 5 fois, avec 1 litre d'eau chaque fois, par décantations et mises en suspensions successives, en éliminant chaque fois les particules d'alumine les plus fines. On sèche enfin à l'étuve à 110° pendant une dizaine d'heures.

#### *Adsorption des acides aminés dicarboxyliques et des peptides acides*

On prépare une colonne de 5 g d'alumine acide (10 mm de diamètre); on la lave soigneusement à l'eau distillée (environ 300 ml) jusqu'à ce que le pH du liquide de lavage soit compris entre 4.8 et 5.0. Une colonne plus acide, retiendrait en partie les acides aminés neutres, comme l'ont montré JUTISZ ET LEDERER<sup>3</sup>. Grâce à un tel lavage, on obtient des résultats également satisfaisants avec des alumines de différentes provenances: "Prolabo", Paris, "Merck", Darmstadt, "Aluminium Ore Co", East St. Louis, Ill. U.S.A.

On verse sur la colonne ainsi préparée de 10 à 20 ml d'une solution saturée d'hydrogène sulfuré et neutralisée (pH 7) contenant environ 20 mg des acides aminés dicarboxyliques ou de peptides acides. On lave ensuite avec 25 ml d'eau saturée d'hydrogène sulfuré pour faire passer les acides aminés neutres et les peptides neutres dans le filtrat. L'élution des acides aminés dicarboxyliques s'effectue par 30 ml d'acide chlorhydrique 2 N à la température de 85°; celle des peptides acides est généralement quantitative déjà avec 30 ml d'acide chlorhydrique N à la température ordinaire.

La cystine se comporte ici de façon particulière: seule en solution, elle est quantitativement adsorbée par l'alumine acide comme un acide aminé dicarboxylique, mais en mélange, son adsorption n'est plus quantitative. Lorsque la cystine est présente dans la solution, il convient donc, comme le recommandent SCHRAMM ET PRIMOSIGH<sup>12</sup> de saturer la solution d'hydrogène sulfuré pour réduire la cystine en cystéine. Cette dernière traverse la colonne avec les autres acides aminés neutres sans subir aucune rétention.

Nous avons traité comme il vient d'être dit tout une série de solutions contenant les unes uniquement des acides aminés dicarboxyliques ou des peptides acides, les autres uniquement des acides aminés neutres, les autres des mélanges d'acides aminés dicarbo-

xyliques et d'acides aminés neutres. Parmi ces solutions, l'une (essai 3) contient les acides aminés neutres correspondant à la partie neutre d'un hydrolysat d'insuline, d'après TRISTRAM<sup>9</sup> dont nous avons indiqué la composition p. 489, et une autre (essai 4) les acides aminés dicarboxyliques correspondant à la partie acide d'un hydrolysat d'insuline, toujours d'après TRISTRAM (p. 489).

Le Tableau II indique quelques-uns des résultats obtenus.

TABLEAU II  
ADSORPTION SUR ALUMINE ACIDE

Les quantités de substances étudiées sont comprises entre 5 et 10 mg.

N = azote d'après KJELDAHL exprimé en azote pour 100 de l'azote de la solution initiale

Sp = dosages spécifiques: (a) Phénylalanine d'après KAPELLER-ADLER<sup>10</sup>; (b) Radical p-amino-benzoyle par spectrographie ( $\lambda = 2.500$ )

No des essais	Substances non adsorbées	% dans le filtrat		Substances adsorbées	% dans l'éluat	
		N	Sp		N	Sp
<b>A. Solutions ne contenant que des acides aminés appartenant à un même groupe</b>						
1	Phénylalanine . . . . .	100	—	—	0	—
2	Cystine réduite par H <sub>2</sub> S . .	100	—	—	0	—
3	Partie neutre d'un "hydrolysat synthétique" d'insuline	99	—	—	1.7	—
4	—	0	—	Partie acide d'un "hydrolysat synthétique" d'insuline	100	—
5	—	0	—	Glutathion . . . . .	100	—
6	—	0	—	Acide glycyl-glutamique .	98	—
7	—	3.1*	—	Ac. p-aminobenzoyl-aspartique . . . . .	97	93 (b)
8	—	6.6*	—	Ac. p-aminobenzoyl-glutamique . . . . .	93	92 (b)
<b>B. Solutions contenant des acides aminés appartenant à des groupes différents</b>						
9	Phénylalanine . . . . .	98	100	Acide glutamique . . . . .	102	0 (a)
10	Phénylalanine + Cystine (+ H <sub>2</sub> S) . . . . .	98	100	Acide glutamique . . . . .	100	0 (a)

\* Correspondant à une impureté non acide

L'examen du Tableau II montre que: 1. les acides dicarboxyliques libres et les peptides sont quantitativement adsorbés sur alumine acide et retrouvés dans l'éluat; 2. les acides aminés neutres ne sont pas retenus par l'alumine acide; 3. la spécificité des séparations est vérifiée d'une part par le dosage de la phénylalanine que l'on retrouve quantitativement dans les filtrats (essais 9 et 10) et dont on a contrôlé l'absence dans les éluats correspondants, et d'autre part par le dosage spectrophotométrique des peptides acides de l'acide p-aminobenzoïque.

### C. Adsorption des acides aminés aromatiques et des peptides à noyaux aromatiques par le charbon

#### Préparation de l'adsorbant

On fait bouillir 0.5 g d'Activit 50 X P\* pendant 5 min avec 4 ml d'acide acétique à 20%; on filtre, puis on lave sur le filtre avec 15 ml d'eau chaude; on fait ensuite passer le charbon dans un bêcher où on le traite par 10 ml d'eau contenant 2 mg d'éphédrine. On agite pendant 10 min, puis on verse le charbon dans une colonne de 10 mm de dia-

\* Cie Activit, 66 rue d'Auteuil, Paris XVI.

mètre intérieur. La colonne d'adsorbant ainsi formée est lavée successivement avec 15 ml d'eau saturée d'hydrogène sulfuré, et avec 35 ml d'une solution d'acide acétique à 5% saturée d'hydrogène sulfuré.

Le traitement à l'éphédrine a pour but de désactiver partiellement le charbon. Nous avons observé en effet, que faute d'une telle désactivation, l'élution des acides aminés aromatiques n'est jamais complète. Il est vraisemblable que l'éphédrine agit en venant se fixer sur des points particulièrement actifs de l'adsorbant. Rappelons à ce point de vue que TISELIUS a utilisé l'éphédrine pour l'élution différentielle de divers sucres<sup>22</sup> et de peptides<sup>6</sup> par déplacement.

### *Adsorption des acides aminés aromatiques et des peptides aromatiques*

Le mélange correspondant à 20 à 30 mg des substances aromatiques dissoutes dans 10 ml d'une solution d'acide acétique à 5% saturée d'hydrogène sulfuré, est versé sur la colonne; celle-ci est ensuite lavée avec 25 ml de la solution d'acide acétique à 5%, saturée d'hydrogène sulfuré. Les substances non aromatiques passent ainsi quantitativement dans le filtrat. Quant à la fraction aromatique adsorbée, elle est quantitativement élueée, dans le cas de la plupart des substances aromatiques, par 125 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle et d'hydrogène sulfuré. Toutefois, le tryptophane libre nécessite, pour son élution, 250 ml, et le glycyl-tryptophane jusqu'à 375 ml du même liquide.

L'élution par l'eau saturée d'acétate d'éthyle a déjà été utilisée par WACHTEL ET CASSIDY<sup>6</sup> dans le cas de quelques acides aminés neutres adsorbés sur Darco G 60, et par TISELIUS<sup>5</sup>. D'autre part, SCHRAMM ET PRIMOSIGH<sup>4</sup> ont proposé d'éluer les acides aminés aromatiques par une solution de phénol à 5% dans une solution aqueuse d'acide acétique à 20%; ils ont effectivement récupéré l'azote total correspondant aux acides aromatiques mis en jeu; toutefois, nous avons constaté que dans ces conditions, le tryptophane est totalement détruit, et la tyrosine et la phénylalanine le sont partiellement. De telles pertes ont été constatées également par TISELIUS, DRAKE ET HAGDAHL<sup>11</sup> avec ce mode d'élution.

Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau III.

TABLEAU III  
ADSORPTION SUR CHARBON

Les quantités de substances étudiées sont comprises entre 10 et 20 mg.

N = Azote d'après KJELDAHL

Sp = Dosages spécifiques: Phénylalanine et Alanyl-phénylalanine d'après KAPELLER-ADLER<sup>19</sup>, Tyrosine et peptides à tyrosine d'après FOLIN ET MARENZI<sup>20</sup>, Tryptophane d'après BATES<sup>21</sup>, Glycyl-tryptophane par spectrographie ( $\lambda = 2.780$ )

No des essais	Substances non adsorbées	% dans le filtrat N	Substances adsorbées	% dans l'éluat	
				N	Sp
<b>A. Solutions ne contenant que des acides aminés appartenant à un même groupe</b>					
1	—	0	Phénylalanine 8.09 mg } * . Tyrosine 13.10 mg }	100	—
2	—	0	Tryptophane . . . . .	100	98
3	Glycyl-glycyl-glycine . . .	100	—	0	—
4	—	0	Glycyl-tryptophane . . . .	101	94
5	—	1.7	Tyrosyl-cystéine . . . . .	98	—
<b>B. Solutions contenant des acides aminés appartenant à des groupes différents</b>					
6	Partie neutre d'un hydrolysat synthétique de 100 mg d'insuline . . . . .	94	Partie aromatique d'un hydrolysat synthétique de 100 mg d'insuline . . . . .	102	—
7	Leucyl-glycine . . . . .	101	Leucyl-tyrosine . . . . .	97	100
8	Glycyl-leucine . . . . .	98	Glycyl-tyrosine . . . . .	100	100
9	Alanyl-glycine . . . . .	100	Alanyl-phénylalanine . . .	100	99

\* Correspondant à la partie aromatique de 100 mg d'insuline

D'après les chiffres du Tableau III, il apparaît que: 1. les acides aminés aromatiques et les peptides à acides aminés aromatiques sont quantitativement retenus sur le charbon et retrouvés dans l'éluat; 2. cette rétention est spécifique, quelle que soit dans les dipeptides la position ou la nature de l'acide aminé aromatique; 3. les acides aminés neutres aliphatiques ne sont absolument pas retenus par le même adsorbant.

#### *D. Influence des sels sur l'adsorption par le gel de silice.*

L'application des méthodes précédentes à des hydrolysats chlorhydriques de protéines se heurte à l'influence du chlorure de sodium résultant de la neutralisation de l'acide chlorhydrique retenu sous forme de chlorhydrates. Cette influence, déjà constatée par SCHRAMM ET PRIMOSIGH<sup>12</sup>, se manifeste par le fait que l'adsorption des bases hexoniques sur le gel de silice n'est plus complète (Tableau IV). Nous avons résolu cette difficulté en neutralisant l'acide chlorhydrique, non plus par la soude, mais par la lithine. Les chiffres du Tableau IV montrent qu'en combinant la neutralisation du milieu par la lithine et l'utilisation d'une colonne de silice plus longue, il est possible de réaliser une adsorption totale et spécifique des bases hexoniques.

TABLEAU IV  
INFLUENCE DES SELS SUR L'ADSORPTION DES BASES  
HEXONIQUES PAR LE GEL DE SILICE

La solution étudiée (environ 25 ml) contient le mélange de bases hexoniques correspondant à 100 mg d'insuline (voir Tableau I).

La colonne de gel de silice a un diamètre de 25 mm.

Silice (g)	Sel présent (mg)	N non adsorbé, en % de N total
20	NaCl 10	3
20	NaCl 50	36
20	KCl 50	50
20	NH <sub>4</sub> Cl 64	35
20	LiCl 37	12
30	LiCl 43	3
35	LiCl 43	2

Des essais préliminaires avec des mélanges synthétiques d'acides aminés nous avaient d'abord fait croire qu'une partie des acides aminés neutres était adsorbée sur gel de silice, en présence de chlorure de lithium. Des vérifications nous ont montré cependant que l'azote adsorbé correspondait à du chlorure d'ammonium présent comme impureté dans les acides aminés utilisés. Cette observation confirme une fois de plus la spécificité de l'adsorption sur gel de silice.

C'est en tenant compte de ces observations que nous avons mis au point la technique de séparation des bases hexoniques décrite plus haut.

Il existe cependant une influence certaine du chlorure de lithium sur le comportement des acides aminés neutres vis-à-vis du gel de silice; nous avons constaté en effet que, comme le montre le Tableau V, si la totalité des acides aminés neutres traverse sans difficulté une colonne de silice de 35 g et de 25 mm de diamètre quand ces acides sont en présence de 56 mg de chlorure de lithium pour 60 ml de solution, il n'en est pas de même en l'absence de ce sel. Dans ce cas, il apparaît une rétention d'une fraction

importante des acides aminés en question, rétention qu'on ne peut éviter qu'en utilisant une colonne de silice beaucoup plus faible, de 6 g d'adsorbant et de 18 mm de diamètre. Mais on a vu plus haut (Tableau IV) qu'une colonne ainsi réduite qui retient quantitativement les bases hexoniques en l'absence de tout sel, ne suffit plus à leur adsorption quantitative en présence de chlorure de lithium.

TABLEAU V

INFLUENCE DES SELS SUR LE COMPORTEMENT DES ACIDES AMINÉS NEUTRES VIS-A-VIS DU GEL DE SILICE

Colonne de 35 g de gel de silice et de 25 mm de diamètre

La solution étudiée contient le mélange d'acides aminés neutres correspondant à 100 mg d'insuline (voir p. 489).

Liquide versé sur la colonne	% N dans le filtrat	
	Mélange sans sel	Mélange contenant 56 mg de LiCl
40 ml de la solution des acides aminés neutres, suivis de 150 ml d'eau . . . . .	53.2 9.0	98.2 1.2
50 ml d'eau . . . . .	36.6	0.8
150 ml d'HCl 0.1 N . . . . .		
Total	98.8	100.2

## II. APPLICATION A L'INSULINE

Il était indispensable de vérifier la validité des techniques précédentes de séparation en les appliquant à une protéine connue. Nous avons choisi ici l'insuline. Cette protéine présente en effet l'avantage de pouvoir être obtenue cristallisée, sous un état que l'on peut considérer comme pur, et dont l'activité biologique constitue une épreuve satisfaisante. D'autre part, l'insuline a fait l'objet de nombreuses investigations concernant sa composition en acides aminés. TRISTRAM<sup>9</sup>, en particulier, a réuni en un tableau critique les chiffres obtenus à ce point de vue par lui-même et par d'autres auteurs, chiffres qui sont actuellement les meilleurs. Ce sont eux que nous utilisons ici comme bases de comparaison.

Nos investigations ont porté d'une part sur un mélange, en présence de chlorure de lithium, de la totalité des acides aminés correspondant à un hydrolysat total d'insuline ("hydrolysat synthétique" du Tableau VI); d'autre part, sur l'hydrolysat chlorhydrique total d'un échantillon d'insuline, parfaitement cristallisée, titrant 27 U.I./mg, provenant de la Maison "Organon", et qui représente de l'insuline pure<sup>23</sup>; d'autre part enfin, sur l'hydrolysat chlorhydrique total d'un échantillon d'insuline commerciale, cristallisée, titrant 22 U.I./mg et qu'il nous a paru intéressant de comparer, en ce qui concerne sa composition en acides aminés, au produit pur.

Voici, à titre d'exemple, le mode opératoire suivi dans le cas de l'insuline à 27 U.I./mg:

110 mg d'insuline finement pulvérisée et séchée sous vide (0.7 mm Hg, 80°, 12 h) sont hydrolysés par 2 à 3 ml d'acide chlorhydrique 5.5 N à l'ébullition pendant 24 heures. L'hydrolysat est ensuite amené exactement à 55 ml. On en prélève 5 ml pour le dosage de l'azote total. Les 50 ml restant sont évaporés trois fois à sec, après additions successives d'eau distillée, dans un dessicateur, sous vide, à la température ordinaire, en

Bibliographie p. 498.

présence d'anhydride phosphorique et de potasse en pastilles. L'acide chlorhydrique subsistant est neutralisé et le milieu légèrement alcalinisé (coloration franchement rose avec la phénolphthaléine) par 16.7 ml de lithine 0.1 N, ce qui correspond à la formation dans le milieu, de 71 mg de chlorure de lithium. On dose alors l'ammoniac sur l'ensemble, en l'entraînant par la vapeur d'eau, sous vide, à 45°.

#### *Chromatographie sur gel de silice*

La solution ainsi débarrassée d'ammoniaque est ramenée à  $p_H$  7 par quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0.1 N. On la fait passer (37 ml) sur une colonne de 35 g de gel de silice; on obtient un filtrat (I) et un éluat. On dose dans ce dernier l'azote total, l'arginine et l'histidine. D'autre part, une partie de l'éluat est concentrée sous vide et soumise à la chromatographie de partage sur papier selon CONSDEN, GORDON ET MARTIN<sup>22</sup>, en utilisant comme solvant le phénol additionné de 0.1% d'ammoniac. On obtient ainsi les trois taches correspondant aux trois bases hexoniques, et uniquement ces taches, ce qui confirme la spécificité de la séparation.

#### *Chromatographie sur alumine acide*

Le filtrat (I) provenant de l'opération précédente est concentré sous vide jusqu'à 5 ml environ, saturé par l'hydrogène sulfuré et neutralisé. On fait passer la solution obtenue (6 ml) sur une colonne de 5 g d'alumine acide, ce qui fournit un filtrat (II) et un éluat. On dose dans ce dernier l'azote total. Une partie de l'éluat est d'autre part concentrée sous vide et soumise à la chromatographie de partage sur papier, en utilisant comme précédemment le phénol additionné de 0.1% d'ammoniac. On obtient ainsi les deux taches correspondant respectivement aux acides glutamique et aspartique, et ces deux taches seulement; là encore, la séparation se montre spécifique.

#### *Chromatographie sur charbon*

Le filtrat (II) provenant de la chromatographie sur alumine acide est évaporé à sec sous vide, et le résidu est dissous dans 10 ml d'une solution d'acide acétique à 5% saturée d'hydrogène sulfuré. Le passage sur une colonne de 0.5 g de charbon donne un filtrat (III) et un éluat. Dans ce dernier filtrat, qui contient la totalité des acides aminés neutres non aromatiques, on dose l'azote total. Dans l'éluat, on dose l'azote total et la tyrosine; en outre, on concentre une partie de l'éluat que l'on soumet à la chromatographie de partage sur papier, toujours en utilisant le phénol additionné de 0.1% d'ammoniac. On obtient dans ces conditions trois taches, dont deux très nettes, correspondant respectivement à la tyrosine et à la phénylalanine, et la troisième, plus faible, placée au-dessous ( $R_F = 0.94$ ) de celle de la phénylalanine, ne correspond à aucun des acides aminés actuellement connus. Nous avons vérifié en particulier qu'elle ne correspond pas au tryptophane. Il convient de remarquer d'ailleurs que le tryptophane n'existe pas dans l'insuline; on peut donc exclure non seulement cet acide aminé, mais aussi ses produits de décomposition éventuelle par hydrolyse chlorhydrique, comme responsables de la tache en question.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté par le Tableau VI.

Ces chiffres montrent que:

i. Il existe un excellent accord entre les valeurs trouvées par la présente méthode pour l'azote total du groupe basique, l'azote total du groupe acide et l'azote total du

TABLEA

SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE EN QUATRE GROUPES DES ACIDES AMINÉS

A = mg d'azote correspondant à 100 mg d'insuline

B = mg d'azote pour 100 mg de N total d'insuline

C = Chiffres publiés par TRISTRAM<sup>9</sup>D = Dosages spécifiques : Arginine et Histidine d'après MACPHERSON<sup>25</sup>, Tyrosine d'après FOLIN ET MARENZI<sup>2</sup>  
Résultats exprimés en mg d'acide aminé pour 100 mg d'insuline.

Groupe	Insuline d'après TRISTRAM N total 15.0 %*			"Hydrolysat synthétique" N total 15.0 %		
	A	B	C	A	B	D
1. Basique:						
Arginine (base) . . .	2.76	18.40	2.95	2.78	19.20	3.00
Histidine HCl, H <sub>2</sub> O . .			6.62			6.28
Lysine, HCl . . . . .			3.10			—
2. Acide:						
Ac. aspartique . . .	2.37	15.80	5.70	2.46	16.40	
Ac. glutamique . . .			18.55			
3. Aromatique:						
Phénylalanine . . . .	1.70	11.30	8.09	1.73	11.53	
Tyrosine . . . . .			13.10			
4. Neutre:						
dont Glycocolle . . .	6.80	45.30	4.30	6.37	42.40	
Ammoniac:						
	1.39	9.26		1.39	9.14	
Total	15.0	100.0		14.7	98.7	

\* Les calculs sont faits à partir de l'azote retrouvé expérimentalement par TRISTRAM (15.0 %) et non

groupe aromatique correspondant à l'"hydrolysat synthétique", et les valeurs données par TRISTRAM pour l'azote total de ces mêmes groupes correspondant à l'insuline.

2. L'accord entre la valeur trouvée ici pour l'azote total du groupe neutre, débarrassé des acides aromatiques, et correspondant à l'"hydrolysat synthétique", et la valeur de TRISTRAM pour l'insuline, est encore satisfaisant quoiqu'un peu moins bon, (écart de 6.3%).

3. L'accord entre les valeurs trouvées pour les différents groupes correspondant respectivement à l'"hydrolysat synthétique", à l'insuline à 27 U.I./mg et à l'insuline d'après TRISTRAM, est en général excellent. Il en résulte d'une part que la méthode que nous préconisons semble digne de confiance, d'autre part que l'insuline à 27 U.I./mg est pure, et d'autre part enfin que les chiffres fournis par TRISTRAM sont confirmés.

4. L'accord entre les résultats des deux analyses de l'insuline à 27 U.I./mg met en relief la fidélité de la méthode.

5. L'insuline à 22 U.I./mg se révèle différente de l'insuline pure non seulement par sa moins grande activité biologique, mais aussi par sa composition chimique.

Le présent travail apporte ainsi une technique éprouvée de séparation des acides aminés et éventuellement des peptides, dans un hydrolysat protéique, en groupes bien distincts. Dans chacun de ces groupes, il devient alors possible de déterminer spécifiquement et quantitativement chacun des acides aminés qui s'y trouvent, soit par

VI

## D'UN HYDROLYSAT CHLORHYDRIQUE TOTAL D'INSULINE CRISTALLISÉE

Phénylalanine d'après KAPELLER-ADLER<sup>19</sup> Glycocolle d'après ALEXANDER, LANDWEHR ET SELIGMAN<sup>20</sup>.

Insuline cristallisée à 27 U.I./mg Essai I N total 15.1 %			Essai II			Insuline crist. à 22 U.I./mg N total 15.75 %		
A	B	D	A	B	D	A	B	D
2.76	18.27	2.85 6.90 —	2.72	18.00	2.81 6.95 —	3.40	21.60	4.56 6.14 —
2.46	16.30		2.47	16.35		3.12	19.80	
1.74	11.52		1.67	11.05		1.46	9.26	
6.38	42.20	11.97	6.53	43.24	4.13	5.82	36.95	9.95
1.66	11.00		1.60	10.60		1.40	8.88	
15.0	99.3		15.0	99.2		15.2	96.5	

pas à partir de l'azote de sa protéine initiale (15.6%).

application de méthodes de dosage spécifique, soit par séparation ultérieure de chacun des acides aminés d'un même groupe par une nouvelle adsorption, sélective, dans des conditions déterminées.

Nous remercions vivement nos collègues qui nous ont aimablement envoyé divers échantillons de peptides et d'insuline, en particulier MM. R. L. M. SYNGE (Londres) et V. DU VIGNEAUD (New York) pour des échantillons de carnosine, V. PRELOG (Zürich) pour l'acide glycyl-glutamique, Y. SUBBAROW (Pearl River, N.Y.) pour l'acide p-aminobenzoyl-aspartique, A. WINTERSTEIN (Bâle) pour l'acide p-aminobenzoyl-glutamique, C. R. HARRINGTON (Londres) pour la tyrosyl-cystéine, M. TAUSK ET J. LENS (Oss) pour l'insuline "Organon".

## RÉSUMÉ

Une méthode d'analyse chromatographique a été mise au point, permettant de séparer quantitativement les acides aminés et les oligopeptides en les quatre groupes suivants:

- I. Dérivés basiques, adsorbés sur gel de silice;
- II. Dérivés acides, adsorbés sur alumine acide;
- III. Dérivés neutres aromatiques, adsorbés sur charbon;
- IV. Dérivés neutres non aromatiques, restant dans le filtrat final.

La préparation des adsorbants et les conditions d'adsorption et d'élation dans chacun de ces groupes ont été étudiées en détail. Les difficultés dues à l'influence du chlorure de sodium sur l'adsorption par la silice ont été évitées en neutralisant l'acide chlorhydrique restant dans un hydrolysat chlorhydrique par la lithine et non pas par la soude.

La spécificité de toutes les séparations a été contrôlée par chromatographie de partage sur papier.

La méthode en question a été utilisée pour la séparation en quatre groupes des acides aminés de l'insuline. Les résultats obtenus confirment ceux publiés par TRISTRAM<sup>9</sup>.

Bibliographie p. 498.

## SUMMARY

A method of chromatographic analysis has been established, allowing of the quantitative separation of amino-acids and oligopeptides into the following four groups:

- I. basic derivatives, adsorbed on silica gel;
- II. acidic derivatives, adsorbed on "acid" alumina;
- III. neutral aromatic derivatives, adsorbed on activated carbon;
- IV. neutral non-aromatic derivatives, remaining in the final filtrate.

The preparation of the adsorbents and the conditions of adsorption and elution for each of these groups have been studied in detail.

By neutralizing with lithium hydroxide instead of sodium hydroxide the hydrochloric acid remaining in a hydrochloric hydrolysate the difficulties caused by the influence of sodium chloride on the adsorption of silica gel have been avoided.

The specificity of all separations has been checked by partition chromatography on paper.

This method was used to separate into four groups the amino-acids of insulin.

The results obtained confirm those published by TRISTRAM<sup>9</sup>.

## ZUSAMMENFASSUNG

Eine chromatographische Analysenmethode wurde entwickelt, die es ermöglicht, die Aminosäuren und Oligopeptide quantitativ in folgende vier Gruppen zu trennen:

- I. basische Derivate, die an Silika-Gel adsorbiert werden;
- II. saure Derivate, die an saurer Tonerde adsorbiert werden;
- III. neutrale aromatische Derivate, die an Kohle adsorbiert werden;
- IV. neutrale nicht-aromatische Derivate, die im Endfiltrat übrig bleiben.

Die Bereitung der Adsorbentia und die Adsorptions- und Elutionsumstände wurden für alle Gruppen eingehend untersucht. Die Schwierigkeiten, die durch den Einfluss von Natriumchlorid auf die Adsorption an Silika-Gel verursacht werden, wurden dadurch vermieden, dass die überschüssige Salzsäure in einem salzsauren Hydrolysat mit Lithiumhydroxyd anstelle von Natronlauge neutralisiert wurde.

Die Spezifität aller Trennungen wurde durch Partitionschromatographie auf Papier kontrolliert.

Die beschriebene Methode wurde zur Trennung der Aminosäuren von Insulin in die vier Gruppen benutzt. Die erhaltenen Resultate bestätigen die von TRISTRAM<sup>9</sup> veröffentlichten.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. LEDERER ET P. K. TCHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 35.
- 2 M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Médecine et Biologie*, 5 (1947) 229.
- 3 M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Nature*, 159 (1947) 445.
- 4 G. SCHRAMM ET J. PRIMOSIGH, *Ber.*, 76 (1943) 373.
- 5 A. TISELIUS, *The Svedberg Memorial*, Vol. 1944, 370.
- 6 J. WACHTEL ET H. G. CASSIDY, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 665.
- 7 T. WIELAND, *Z. physiol. Chem.*, 273 (1942) 24.
- 8 F. TURBA ET M. RICHTER, *Ber.*, 75 (1942) 340.
- 9 G. R. TRISTRAM, *Biochem. J.*, 40 (1946) 721.
- 10 E. SPERBER, *J. Biol. Chem.*, 166 (1946) 75.
- 11 A. TISELIUS, B. DRAKE ET L. HAGDAHL, *Experientia*, 3 (1947) 651.
- 12 G. SCHRAMM ET J. PRIMOSIGH, *Ber.*, 77 (1944) 417.
- 13 A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 37 (1943) 79.
- 14 R. HARRIS ET A. N. WICK, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 18 (1946) 276.
- 15 F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.*, 40 (1946) 688.
- 16 T. WIELAND, *Naturwissenschaften*, 30 (1942) 374.
- 17 T. WIELAND, *Ber.*, 77 (1944) 539.
- 18 M. S. BERGDOLL ET D. M. DOTY, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 18 (1946) 600.
- 19 R. KAPELLER-ADLER, *Biochem. Z.*, 252 (1932) 185.
- 20 O. FOLIN ET A. D. MARENZI, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 89.
- 21 R. W. BATES, *J. Biol. Chem.*, 119 (1937) VII.
- 22 A. TISELIUS ET L. HAHN, *Kolloid-Z.*, 105 (1943) 177.
- 23 J. LENS, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 76.
- 24 R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- 25 H. T. MACPHERSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 470.
- 26 B. ALEXANDER, G. LANDWEHR ET A. M. SELIGMAN, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 51.

Reçu le 2 juillet 1948