

MICRODOSAGE SPÉCIFIQUE DE L'ACIDE ASPARTIQUE ET DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

par

CLAUDE FROMAGEOT ET ROGER COLAS

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

On sait que parmi les hydroxyacides qui prennent naissance par action de l'acide nitreux sur les acides aminés actuellement connus comme constituants des protéines, l'acide lactique, l'acide glutamique, l'acide malique et l'acide déhydroxybutyrique, correspondant respectivement à lalanine, la sérine, l'acide aspartique et la thréonine, fournissent de l'acétaldéhyde par oxydation par le permanganate. FROMAGEOT ET HEITZ¹ ont constaté que cette formation d'acétaldéhyde n'a plus lieu à partir de l'acide glycérique ou de l'acide malique, si ces acides sont en présence d'acétate mercurique; il en est vraisemblablement de même en ce qui concerne l'acide déhydroxybutyrique. Ces réactions constituent la base d'une méthode de dosage spécifique de lalanine, dans un hydrolysat de protéine, par exemple; mais elles n'avaient pu être utilisées jusqu'ici pour le dosage spécifique de l'acide aspartique, puisque l'acide malique se comporte vis-à-vis de l'acétate mercurique comme les hydroxyacides générateurs d'acétaldéhyde autres que l'acide lactique.

La séparation quantitative par chromatographie, d'après FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER², des acides aminés en diverses fractions dont une renferme uniquement les acides aminés dicarboxyliques, et une autre uniquement les acides aminés neutres non aromatiques, permet maintenant d'utiliser les réactions précédentes pour le dosage spécifique de l'acide aspartique, et dans un grand nombre de cas, pour celui de l'acide glutamique.

Le *principe* de ces dosages est le suivant: Le mélange des acides aminés, correspondant par exemple à un hydrolysat de protéines, est tout d'abord soumis à la séparation en groupes d'après FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER²; après avoir été ainsi isolés des autres acides aminés, les acides dicarboxyliques sont transformés par l'acide nitreux en hydroxyacides, puis ces derniers sont oxydés par l'acide permanganique; seul alors l'acide aspartique agit en générateur d'acétaldéhyde qu'il est facile de recueillir et de doser spécifiquement. L'acide glutamique est calculé par différence entre l'azote total de la fraction éluee de l'alumine et l'azote de l'acide aspartique.

MODE OPÉRATOIRE

La *séparation chromatographique* quantitative des acides aminés en groupes a été décrite dans un travail précédent³. Nous signalerons seulement ici que la quantité d'alumine "acide" que l'on doit utiliser dépend naturellement de la quantité des acides dicarboxyliques à séparer; il peut être nécessaire d'opérer, par exemple, avec 10 g

d'alumine, au lieu des 5 g dont il est question dans le travail de FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER², dont les données s'appliquent plus particulièrement à l'insuline.

Les réactions de désamination et d'oxydation se font dans des conditions qui diffèrent de celles indiquées autrefois par FROMAGEOT ET HEITZ¹, de telle sorte qu'elles permettent de doser des quantités d'acétaldéhyde très inférieures à celles indiquées par ces auteurs. L'appareil utilisé est analogue à celui que ALEXANDER ET SELIGMAN³ ont décrit pour le dosage de lalanine; il en diffère par le ballon à réaction, muni d'un rodage normalisé Pyrex no. 2, dont le volume est ici de 100 ml et qui possède une étroite (6 mm de diamètre intérieur) tubulure latérale. Le volume du liquide prélevé sur la fraction des acides dicarboxyliques doit être de 15 ml au maximum. On introduit ce liquide dans le ballon, on ajoute 10 ml d'acide sulfurique 2 N, on porte au bain-marie bouillant, puis, par la tubulure latérale, on introduit goutte à goutte, en agitant vivement au moyen d'un agitateur mécanique 25 ml d'une solution de nitrite de sodium à 5%; la durée de cette introduction doit être de 15 minutes. On rince ensuite la tubulure latérale avec 0.5 à 1 ml d'eau, et on maintient encore 15 minutes le ballon au bain-marie. La désamination est alors terminée. Le ballon étant toujours au bain-marie, on y introduit goutte à goutte, en 15 minutes, toujours en agitant, 7.5 ml d'une solution d'urée à 30%. Il est important que l'acide nitreux soit complètement détruit après cette opération, car des traces de vapeurs nitreuses s'opposeraient à l'utilisation ultérieure du p-hydroxydiphényle pour le dosage colorimétrique de l'acétaldéhyde formé. Après la destruction de l'acide nitreux par l'urée, on rince la tubulure latérale avec 1 ml d'eau, on la ferme, puis on évapore le contenu du ballon sous vide, jusqu'à début de siccité.

On introduit dans le ballon 5 ml d'acide phosphorique 2 N, 1 ml d'une solution de sulfate de manganèse ($\text{SO}_4\text{Mn, H}_2\text{O}$) à 10% et une pincée de talc, puis on le relie à son réfrigérant; on introduit d'autre part dans la tubulure latérale l'extrémité d'une pipette destinée à l'adjonction du permanganate de potassium. Enfin, le tube récepteur, jaugé à 5 ml, est plongé dans un bain de glace; il contient 3 ml d'une solution de bisulfite de sodium à 1%. On provoque une légère dépression dans l'appareil, par aspiration à la trompe, puis on porte le contenu du ballon à ébullition douce, en y introduisant goutte à goutte, en 15 minutes, 10 ml de la solution de permanganate de potassium 0.2 N; on maintient encore l'ébullition pendant 10 minutes; il est important que l'ébullition soit assez douce pour éviter toute condensation soit dans la tubulure latérale, soit dans le tube reliant le réfrigérant au tube récepteur.

Le contenu du tube récepteur est complété à 5 ml, et l'acétaldéhyde recueilli est dosé par colorimétrie, soit par le p-hydroxydiphényle³ soit par le nitroprussiate¹, selon les procédés habituels. La méthode au nitroprussiate, moins sensible que celle au p-hydroxydiphényle, a en outre l'inconvénient que la coloration obtenue étant fugace, les lectures photométriques doivent être faites de 3 à 5 minutes après le mélange des réactifs; mais elle a l'avantage sur la méthode au p-hydroxydiphényle d'être moins susceptible à des traces d'impuretés. Parfois, en effet, la coloration obtenue par ce dernier réactif se révèle capricieuse, et fournit, sans cause apparente, un résultat de dosage aberrant.

Le report, sur une courbe obtenue à partir de solutions connues d'acide aspartique, des densités optiques mesurées à partir des solutions à doser, permet de déterminer facilement la teneur en acide aspartique de ces dernières. Les quantités d'acide aspartique, qu'il est ainsi possible de déterminer, sont de l'ordre de 15 à 75 μg quand on utilise la colorimétrie par le p-hydroxydiphényle, et de 0.15 à 2.0 mg, quand on utilise le nitroprussiate.

RÉSULTATS

Le Tableau I montre les résultats obtenus dans le dosage de quantités connues d'acide aspartique en présence d'acide glutamique.

Les chiffres du Tableau I montrent que, en moyenne, la présence d'acide glutamique abaisse de 5% le rendement en acétaldéhyde obtenu à partir des solutions ne contenant que de l'acide aspartique. Il convient donc, pour avoir des valeurs aussi exactes que possible, de multiplier les chiffres expérimentaux obtenus par 1.05.

TABLEAU I

DOSAGE DE L'ACIDE ASPARTIQUE DANS DES MÉLANGES CONNUS D'ACIDE ASPARTIQUE ET D'ACIDE GLUTAMIQUE

Acétaldéhyde dosé par le nitroprussiate à l'aide du photomètre de PULFRICH

Composition et volume de la solution des acides aminés dicarboxyliques			Acide aspartique retrouvé	
Aspartique (μg)	Glutamique (μg)	Volume (ml)	Valeur absolue	% de la quantité initiale
500	0	2.5	501	100
1 000	0	5.0	1 000	100
500	3 540	7.5	519	104
600	600	6.0	580	97
			600	100
			610	102
600	1 800	12.0	575	96
			535	89
600	3 000	15.0	560	94
			540	90
			600	100
			535	89
1 000	1 416	7.0	930	93
1 000	3 054	10.0	916	92
2 000	703	11.0	1 874	93
Moyenne en présence d'acide glutamique:				95

Le procédé de dosage qui vient d'être décrit a été appliqué d'autre part au dosage des acides dicarboxyliques dans quelques protéines. Les chiffres obtenus sont donnés dans le Tableau II.

Les chiffres du Tableau II appellent les remarques suivantes:

1. L'accord entre les valeurs trouvées pour l'acide aspartique et pour l'acide glutamique dans le présent travail et celles publiées précédemment est tout à fait satisfaisant dans le cas de l'insuline, de l'édestine et de la zéine.

2. Cet accord n'existe pas dans le cas de la gélatine; mais on doit observer que les valeurs indiquées précédemment pour cette substance ont été obtenues au cours de travaux déjà anciens, et par des procédés dont on sait aujourd'hui qu'ils ne donnent pas de résultats quantitatifs. On peut donc conclure que ce sont les chiffres du présent travail qui correspondent le mieux à la teneur réelle de la gélatine en acide aspartique et acide glutamique.

3. Dans le cas du lysozyme, l'accord est très satisfaisant entre la valeur trouvée pour l'acide aspartique par la présente méthode, et celle que fournit la chromatographie quantitative de partage sur papier d'après FISHER *et coll.* Mais il n'en est pas de même

TABLEAU II

DOSAGE DE L'ACIDE ASPARTIQUE ET DE L'ACIDE GLUTAMIQUE DANS QUELQUES PROTÉINES.
ACIDE GLUTAMIQUE CALCULÉ PAR DIFFÉRENCE

Les chiffres ci-dessous sont les moyennes de deux déterminations au moins.

Protéine	N total	N de la fraction dicarboxylique % de la protéine	Acide aspartique trouvé % de la protéine		Acide glutamique trouvé % de la protéine		
			Présent travail	Publié précédemment*	Présent travail	Publié précédemment*	
Gélatine	18.3	1.47	3.1	3.5 9.7	(4) (5)	12.0 6.0 6.2	(4) (5)
Globine (lapin)	16.0	0.59	4.2	—	—	1.5	—
Insuline**	15.9	2.39	5.3	5.7 6.8	(6) (7)	19.3	18.6 20.2 (7)
Lysozyme	16.7	2.61	10.2	10.9	(8)	[16.2]	3.0 3.5 (8) (9)
Édestine	18.6	2.73	10.5	12.0 10.1	(10, 11) (12)	16.9	20.6 20.3 (10) (11) 19.0 (12)
Zéine	16.0	3.67	3.5	3.2 3.4	(13) (14)	35.0	35.6 30.9 (13) (14)

* Nous ne donnons ici que les valeurs les plus probables. On en trouvera d'autres dans la bibliographie donnée par BLOCK¹⁵.

** Insuline cristallisée, à 27 U.I./mg, aimablement offerte par Dr J. LENS, que nous remercions ici bien vivement.

pour l'acide glutamique; il apparaît ainsi que la détermination de cet acide par différence n'est pas possible dans le cas du lysozyme; nous attribuons ce fait à la richesse particulière du lysozyme en tryptophane. La destruction de cet acide aminé au cours de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique entraîne la destruction d'une fraction notable d'autres acides aminés (tyrosine, histidine, etc.) et il est probable que ce sont des fragments azotés résultant de ces destructions, fragments ne réagissant pas à la ninhydrine, qui sont responsables de la richesse en azote de la fraction correspondant à l'éluat de l'alumine "acide".

RÉSUMÉ

Dans la méthode de dosage proposée, le mélange des acides aminés provenant de l'hydrolyse d'une protéine est d'abord soumis à la séparation en groupes d'après FROMAGEOT, JUTISZ et LEDERER; après avoir été ainsi isolés des autres acides aminés, les acides dicarboxyliques sont transformés par l'acide nitreux en hydroxyacides, puis ces derniers sont oxydés par l'acide permanganique; seul alors l'acide aspartique agit en générateur d'acétaldéhyde, que l'on dose soit par le p-hydroxydiphényle, soit par le nitroprussiate. L'acide glutamique est calculé par différence entre l'azote total de la fraction élue de l'alumine et l'azote de l'acide aspartique. La méthode permet de doser des quantités d'acide aspartique comprises entre 0.015 et 2.0 mg avec une approximation de 5%. Appliquée à diverses protéines, elle a fourni les résultats suivants: *gélatine*: acide aspartique 3.1, acide glutamique 12.0%; *globine (lapin)*: acide aspartique 4.2, acide glutamique 1.5%; *insuline*: acide aspartique 5.3, acide glutamique 19.3%; *lysozyme*: acide aspartique 10.2; *édestine*: acide aspartique 10.5, acide glutamique 16.9%; *zéine*: acide aspartique 3.5, acide glutamique 34.8%. La méthode ne s'applique pas à la détermination de l'acide glutamique dans les protéines riches en tryptophane comme le lysozyme.

SUMMARY

In the proposed method, the mixture of amino-acids resulting from the hydrolysis of a protein is first separated into groups as described by FROMAGEOT, JUTISZ, AND LEDERER, after isolation from

the other amino-acids the dicarboxylic acids are converted by nitrous acid into hydroxyacids and the latter are oxidized by permanganic acid; under these conditions, only aspartic acid produces acetaldehyde which is determined quantitatively by p-hydroxydiphenyl or by nitroprussiate. The amount of glutamic acid is calculated from the difference between the total nitrogen content of the eluted fraction and the nitrogen content of the aspartic acid. This method allows the determination of aspartic acid in amounts between 0.015 and 2.0 mg with a maximum error of 5 %. The following results were obtained with different proteins: *gelatin*: aspartic acid 3.1 glutamic acid 12.0 %; *globin* (rabbit): aspartic acid 4.2, glutamic acid 1.5 %; *insuline*: aspartic acid 5.3, glutamic acid 19.3%; *lysozyme*: aspartic acid 10.2; *edestin*: aspartic acid 10.5, glutamic acid 16.9; *zein*: aspartic acid 3.5, glutamic acid 34.8. This method cannot be used for the determination of glutamic acid in proteins rich in tryptophan such as lysozyme.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgeschlagenen Methode wird die von einem Eiweisshydrolysat herrührende Mischung von Aminosäuren zuerst nach FROMAGEOT, JUTISZ UND LEDERER in Gruppen geteilt; die so isolierten Dicarbonsäuren werden mit salpetriger Säure in Hydroxysäuren verwandelt und dann mit Permanaganat oxydiert; nur aus der Asparaginsäure entsteht dann Acetaldehyd und dieses wird mit p-Hydroxydiphenyl oder mit Nitroprussiat bestimmt. Die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff der aus dem Aluminiumoxyd eluierten Fraktion und dem Asparaginsäurestickstoff ergibt den Glutaminsäuregehalt. Mit dieser Methode können 0.015 bis 2.0 mg Asparaginsäure mit einer Genauigkeit von 5 % bestimmt werden. Bei Anwendung auf verschiedene Eiweissstoffe wurden die folgenden Ergebnisse erhalten: *Gelatine*: Asparaginsäure 3.1 %, Glutaminsäure 12.0 %; *Globin* (Kaninchen): Asparaginsäure 4.2 %, Glutaminsäure 1.5 %; *Insulin*: Asparaginsäure 5.3 %; Glutaminsäure 19.3 %; *Lysozym*: Asparaginsäure 10.2 %; *Edestin*: Asparaginsäure 10.5 %, Glutaminsäure 16.9 %; *Zein*: Asparaginsäure 3.5 %, Glutaminsäure 34.8 %. Die Methode kann nicht für die Glutaminsäurebestimmung in tryptophanreichen Eiweissstoffen wie Lysozym angewendet werden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. FROMAGEOT ET P. HEITZ, *Mikrochim. Acta*, 3 (1938) 52.
- ² C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ³ B. ALEXANDER ET G. SELIGMAN, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 9.
- ⁴ H. D. DAKIN, *J. Biol. Chem.*, 44 (1920) 499.
- ⁵ H. L. KINGSTON ET S. B. SCHRYVER, *Biochem. J.*, 18 (1924) 1070.
- ⁶ A. C. CHIBNALL, *J. Intern. Soc. Leather Trades' Chemists*, 30 (1946) 1.
- ⁷ V. DU VIGNEAUD, Cité par E. BRAND, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 47 (1946) 187.
- ⁸ C. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 82.
- ⁹ J. C. LEWIS ET H. F. ALCOTT, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 265.
- ¹⁰ A. C. CHIBNALL, *The Bakerian Lecture*, 1942.
- ¹¹ A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 1369.
- ¹² D. B. JONES ET O. MOELLER, *J. Biol. Chem.*, 79 (1928) 429.
- ¹³ M. A. B. BRAZIER, *Biochem. J.*, 24 (1930) 1188.
- ¹⁴ T. LAINE, *Suomen Kemistilehti*, 12B (1939) 23.
- ¹⁵ R. J. BLOCK ET D. BOLLING, *The Amino Acid Composition of Proteins and Foods* (1945) 254.
- ¹⁶ R. B. FISHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.

Reçu le 4 janvier 1949