

SÉPARATIONS CHROMATOGRAPHIQUES D'ACIDES AMINÉS ET DE PEPTIDES

V. LES ACIDES AMINÉS INDIVIDUELS DE L'INSULINE AVEC UNE NOTE SUR LE DOSAGE DE LA PROLINE

par

ROGER ACHER, CLAUDE FROMAGEOT ET MARIAN JUTISZ

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

Dans la dernière publication de cette série¹, nous avons décrit une méthode permettant de séparer quantitativement les acides aminés et éventuellement les peptides provenant de l'hydrolyse d'une protéine en les groupes suivants: composés basiques, composés acides, composés neutres aromatiques et composés neutres non aromatiques. Prenant comme références les résultats obtenus antérieurement par TRISTRAM², nous avons vérifié la validité de cette méthode en l'appliquant à un hydrolysats total d'insuline, dont les acides aminés avaient pu être ainsi fractionnés en groupes bien distincts. Dans le présent travail, nous déterminons la proportion de chacun des acides aminés dans chacun de ces groupes, nous étudions la validité de la méthode quantitative de chromatographie sur papier, dont le principe a été donné par FISHER, PARSONS ET MORRISON³ et par BRIMLEY⁴, en l'appliquant aux fractions contenant les acides aminés neutres, aromatiques et non aromatiques; enfin nous indiquons, basé sur la chromatographie quantitative sur papier, un procédé de dosage spécifique de la proline.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

TECHNIQUES

Insuline. L'insuline utilisée est de l'insuline cristallisée à 27 U.I./mg. Elle a la même origine que celle de notre précédent travail. Son hydrolyse complète a été faite par l'acide chlorhydrique 5.5 N, en tube scellé, sous vide, à 110° pendant 24 h.; le traitement et le fractionnement de l'hydrolysats ont été décrits antérieurement¹.

Méthodes analytiques. Le dosage des acides aminés individuels est effectué par les procédés suivants:

Bases hexoniques: Arginine et histidine d'après SAKAGUCHI ET PAULI respectivement, selon les procédés de McPHERSON⁵; lysine calculée par différence.

Acides dicarboxyliques: Acide aspartique d'après FROMAGEOT ET COLAS⁶; acide glutamique calculé par différence.

Bibliographie p. 88.

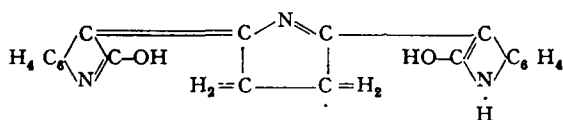
Acides aminés neutres aromatiques: Phénylalanine d'après FISHER *et col.*³; tyrosine d'après FOLIN ET MARENZI⁷.

Acides aminés neutres non aromatiques: Glycocolle d'après ALEXANDER, LANDWEHR ET SELIGMAN⁸ et d'après FISHER *et col.*; alanine et sérine d'après FISHER *et col.*; thréonine d'après WINNICK⁹ et d'après FISHER *et col.*; valine, leucine et isoleucine d'après SCHWEIGERT, MCINTYRE, ELVEHJEM ET STRONG¹⁰ à l'aide de *Lactobacillus arabinosus*, et, pour la valine, d'après FISHER *et col.*; proline d'après la méthode indiquée ci-dessous. La cystine est déterminée sur un hydrolysats spécial, d'après FOLIN ET MARENZI¹¹.

En ce qui concerne la méthode de FISHER *et col.*, elle est utilisée dans les conditions décrites dans une publication précédente¹²; le nombre des taches ayant servi à l'établissement des moyennes est indiqué entre parenthèses.

Dosage de la proline

La proline était jusqu'ici assez difficile à doser de façon spécifique; aucune méthode chimique n'était capable de s'appliquer à des quantités de l'ordre de quelques microgrammes. Le procédé que nous utilisons ici consiste en une chromatographie quantitative sur papier, au cours de laquelle la proline est révélée par l'isatine, et non par la ninhydrine. GRASSMANN ET VON ARNIM¹³ ont montré que l'isatine donne avec la proline une coloration bleue, due à la formation du composé:



Ils avaient déjà constaté la fixation de la matière colorante sur des fibres d'acétate de cellulose, et utilisé ce phénomène pour la microcaractérisation de la proline. Ici, la proline ayant été séparée par chromatographie sur papier, la réaction est exécutée sur le papier, et la concentration en proline est déterminée d'après la surface des taches formées, surface qui est, selon FISHER *et col.*³, proportionnelle au logarithme de la concentration en l'acide aminé.

Mode opératoire. Soit à doser la proline dans un hydrolysats de protéine obtenu par action de l'acide chlorhydrique. L'hydrolysats ayant été soumis aux séparations indiquées précédemment¹, la proline se trouve dans le filtrat final, avec l'ensemble des acides monoaminés monocarboxyliques non aromatiques. On concentre éventuellement cette dernière fraction et, par dilution convenable, on en prépare une solution, telle que la concentration en proline soit comprise entre 300 et 1500 μg par ml. On dispose d'autre part d'une série de solutions de proline pure, de concentrations échelonnées entre 300 et 1500 μg par ml, et qui servent à établir une échelle de référence. De chacune de ces solutions on prélève des volumes rigoureusement égaux, compris entre 3 et 5 μl , qu'on dépose à la partie supérieure de la feuille de papier utilisée pour la chromatographie (papier Whatman no 1). On opère ensuite de la façon habituelle, en développant par du butanol normal additionné de 10% d'éthanol absolu, le mélange étant saturé d'eau. Le R_F de la proline est alors de 0.20, et la séparation de la proline des autres acides aminés neutres non aromatiques est très bonne. L'isatine est utilisée en solution à 0.2% dans du butanol normal contenant 4% d'acide acétique pur. Dans ces conditions la proline donne des taches d'un bleu intense, régulières, se détachant nettement sur un

fond légèrement jaune, et particulièrement commodes pour des déterminations quantitatives; on abandonne 24 h à l'obscurité et on mesure les surfaces au planimètre. On opère ensuite comme dans le cas général: utilisant les valeurs trouvées à l'aide des solutions étalons, on trace la droite représentant les surfaces en fonction des logarithmes des concentrations; le report sur cette droite des valeurs trouvées pour les surfaces des taches fournies par les solutions à doser permet de déterminer les quantités de proline contenues dans chacune de ces solutions.

Remarques. Sauf l'hydroxyproline, les autres acides aminés susceptibles d'accompagner la proline ne donnent avec l'isatine que des taches roses peu visibles et qui disparaissent après quelques heures, alors que les taches bleues de la proline persistent avec toute leur intensité pendant plusieurs jours. Quant à l'hydroxyproline, elle fournit des taches qui, à concentrations égales, présentent une coloration beaucoup plus faible que celles de la proline; cette faiblesse de coloration empêche l'emploi de la même méthode pour le dosage spécifique de l'hydroxyproline. Les taches données par cette dernière ne gênent d'ailleurs nullement le dosage de la proline, car, sur le papier, elles se placent bien au-dessus de celles de cet acide aminé.

La coloration bleue n'est stable que si elle est fixée sur un support solide, papier (cellulose), ou acétate de cellulose; malgré de nombreuses tentatives, nous ne sommes pas arrivés à établir des conditions telles que la coloration résultant de la réaction entre isatine et proline soit suffisamment stable en solution pour permettre des mesures spectrophotométriques précises.

RÉSULTATS

Nous donnons les résultats obtenus au cours de l'analyse totale de l'insuline dans les Tableaux I et II. A titre de comparaison, nous indiquons dans le Tableau II les chiffres publiés précédemment d'une part par BRAND¹⁴ et d'autre part par CHIBNALL^{15, 16} et par TRISTRAM^{2, 17}. Ces résultats montrent que:

1. Il existe un accord très satisfaisant entre l'azote total de chacun des groupes séparés par chromatographie et l'azote de la somme des acides aminés contenus dans chacun de ces groupes, cette somme étant calculée soit à partir des données des auteurs anglais, soit à partir des données actuelles. Cet accord indique que les divers acides aminés de l'insuline se comportent, au cours de l'hydrolyse acide de la protéine, tout autrement que ceux du lysozyme¹⁸; ils se révèlent beaucoup plus stables. Peut-être cette différence est-elle due à l'absence de tryptophane dans l'insuline; on sait, en effet, que la destruction du tryptophane au cours de l'hydrolyse acide d'une protéine entraîne souvent celle de toute une série d'autres acides aminés, et ce, d'une façon encore difficilement prévisible.

2. Il existe un accord général satisfaisant entre les valeurs de chaque acide aminé, déterminées individuellement dans le présent travail d'une part, et dans les travaux antérieurs d'autre part. Dans l'ensemble, les écarts entre nos résultats et ceux de CHIBNALL et de TRISTRAM sont suffisamment faibles pour que nous trouvions les mêmes nombres entiers de résidus d'acides aminés dans l'unité élémentaire d'insuline, de poids "moléculaire" de 12 000.

3. Trois acides aminés font toutefois exception; ce sont l'acide glutamique et la leucine, pour chacun desquels nous trouvons un résidu de plus, et la proline pour laquelle nous trouvons un résidu de moins.

TABLEAU I
ACIDES AMINÉS DE L'INSULINE
CHIFFRES EXPRIMÉS EN G D'ACIDES AMINÉS POUR 100 G DE PROTÉINE A 15.3% D'AZOTE TOTAL

Acide aminé	Analyse par méthode autre que la chromatographie sur papier	Analyse par chromatographie sur papier	Moyenne générale
Arginine*	2.87	—	2.87
Histidine*	5.00	—	5.00
Lysine*	2.72	—	2.72
Ac. aspartique	5.45	—	5.45
Ac. glutamique	19.3	—	19.3
Phénylalanine	—	8.2 (5)	8.2
Tyrosine	12.2	—	12.2
Glycocolle	4.1	4.8 (9)	4.5
Alanine	—	4.6 (7)	4.6
Sérine	—	5.2** (9)	5.2
Cystine	12.4	—	12.4
Thréonine	2.3	2.2 (9)	2.3
Valine	7.1	7.4 (14)	7.3
Leucine	14.6	—	14.6
Isoleucine	1.6	—	1.6
Proline	—	2.0	2.0
Amide (N)	1.4	—	1.4

* Base libre.

** Corrigé de + 8% pour tenir compte de la destruction au cours de l'hydrolyse.

En ce qui concerne l'acide glutamique, nous trouvons expérimentalement un nombre de résidus de 16, ce résultat étant obtenu par différence entre l'azote total de la fraction "acide" et l'azote de l'acide aspartique; l'accord entre cette valeur et celle de CHIBNALL (15.2 arrondi à 15) est, en fait, satisfaisant, et dans l'état actuel des méthodes chimiques d'analyse il est impossible de décider entre les valeurs de 15 et 16 pour le nombre de résidus d'acide glutamique dans l'unité élémentaire d'insuline.

Pour la leucine, la valeur déterminée par nous (13.4 résidus, arrondis à 13) ne s'écarte que de 8% de celle (12.4 résidus, arrondis à 12) trouvée par TRISTRAM; là encore, il est difficile de décider entre ces deux valeurs; mais comme au cours du dosage microbiologique de la leucine nous avons retrouvé les mêmes résultats avec un mélange synthétique d'acides aminés correspondant à l'hydrolysate d'insuline, nous pensons que la valeur 13 pour le nombre de résidus de leucine dans l'unité élémentaire d'insuline est la plus probable.

En ce qui concerne la proline, la différence entre notre résultat (2.2 résidus, arrondis à 2) et celui de TRISTRAM (2.7 résidus, arrondis à 3), n'est considérable, étant donné les méthodes utilisées, que par le fait d'avoir arrondi au nombre le plus proche: l'écart passant ainsi de 20 à 50%. La comparaison de la surface des taches obtenues à partir d'un hydrolysate réel d'insuline d'une part, et d'un mélange d'acides aminés de même composition, mais contenant la proportion de proline (2.56%) indiquée par TRISTRAM, nous a montré qu'il y a nettement moins de proline dans l'hydrolysate de la protéine. Si on écarte l'hypothèse d'une destruction d'une partie de la proline au cours de l'hydrolyse, on est conduit à admettre qu'il y a seulement 2 résidus de proline dans l'unité élémentaire d'insuline.

TABEAU II
BILAN DES DIVERSES FORMES D'AZOTE DANS L'INSULINE

A = azote des acides aminés pour 100 de l'azote total de la protéine

F = azote des diverses fractions, calculé à partir de l'azote des acides aminés pour les résultats de BRAND, de CHIBNALL et de TRISTRAM, ou trouvé expérimentalement dans les fractions isolées par chromatographie pour le présent travail.

C = azote calculé à partir du nombre des résidus (R) des acides aminés contenus dans la fraction. Azote total des échantillons d'insuline analysés: BRAND¹⁴ 16.0%, CHIBNALL^{15, 16} et TRISTRAM^{2, 17} 15.5%, présent travail 15.3%.

Formes de l'azote	BRAND		CHIBNALL, TRISTRAM		Présent travail			
	F	A	F	A	F	A	R	C
Fraction basique	19.1		17.7		18.2			18.2
Arginine		7.0		6.2		6.0	2	
Histidine		9.0		8.5		8.8	4	
Lysine		3.1		3.0		3.4	2	
Fraction acide	16.5		15.2		15.8			16.0
Ac. aspartique		4.5		3.8		3.8	5	
Ac. glutamique		12.0		11.4		12.0	16	
Fraction aromatique	10.1		10.4		11.4			10.6
Phénylalanine		4.2		4.4		4.6	6	
Tyrosine		5.9		6.0		6.1	8	
Fraction neutre non aromatique	40.7		43.9		42.7			44.3
Glycocolle		5.4		5.2		5.5	7	
Alanine		—		4.4		4.7	6	
Sérine		4.8		4.5		4.5	6	
Cystine		8.0		9.4		9.5	6	
Thréonine		2.3		1.6		1.8	2	
Valine		6.6		5.8		5.8	8	
Leucine		8.9		9.3		10.2	13	
Isoleucine		1.9		1.7		1.1	2	
Proline		2.2		2.0		1.6	2	
Amide	11.0		8.9		9.2		12	9.2
Total	97.4		96.1		97.3			98.3

Quoiqu'il en soit de ces quelques différences, qui restent minimes, l'accord général qui existe entre les résultats du présent travail et ceux obtenus par les auteurs anglais dans l'analyse de la même protéine, montre la validité, au point de vue quantitatif comme au point de vue qualitatif, de la méthode de séparation en groupes par chromatographie, telle que nous l'avons précédemment décrite¹.

D'autre part, nous avons constaté que la méthode "quantitative" de chromatographie sur papier, préconisée par FISHER *et col.*, si elle permet d'avoir une idée de l'ordre de grandeur de la concentration de certains acides aminés dans un hydrolysate de protéine, et si, à ce titre, elle rend de grands services lorsqu'aucune autre méthode n'est disponible, ne permet souvent pas d'obtenir une précision suffisante; c'est ce que nous avons vu, en particulier, dans le cas de la leucine, de l'isoleucine et de la tyrosine. Pour d'autres acides aminés, comme la thréonine et la valine, les résultats sont généralement meilleurs. La proline donne des résultats satisfaisants, ce qui est dû à la spécificité de sa réaction avec l'isatine, et à la netteté des taches obtenues.

Remarques sur les résultats obtenus dans les dosages des acides aminés constitutifs d'une protéine. Application à l'insuline.

Il n'existe guère de criterium absolu de l'exactitude des chiffres fournis par le dosage des acides aminés constituant une protéine donnée. Un bon argument de la validité de ces chiffres est leur reproductibilité par des méthodes analytiques foncièrement différentes. Un argument souvent utilisé pour s'assurer que l'analyse d'une protéine est pratiquement complète est le fait que l'azote de l'ensemble des acides aminés et des amides est pratiquement égal à l'azote total de la protéine. Mais cet argument ne signifie aucunement que les résultats de l'analyse soient justes: des compensations d'erreurs peuvent se produire, et d'autant plus que le nombre d'espèces différentes d'acides aminés est plus grand. Il nous paraît utile de donner ici une méthode de calcul qui limite, si elle ne la supprime pas, la possibilité de telles compensations. Cette méthode consiste à comparer les valeurs du poids moléculaire de la protéine obtenues à partir d'une part de l'azote total et du nombre d'atomes d'azote de la protéine, et d'autre part des résultats analytiques concernant les acides aminés individuels. Ces valeurs, sans coïncider exactement, doivent être suffisamment proches l'une de l'autre. En fait, si on connaissait le nombre des acides aminés en bout de chaîne, on pourrait ajouter à la somme des poids des résidus le poids d'un nombre de molécules d'eau égal à la moitié du nombre de ces acides aminés, et les valeurs du poids moléculaire de la protéine, calculées par les deux méthodes, devraient être égales.

Pour la première détermination, soit a la teneur d'azote total en pour cent de la protéine et b le nombre d'atomes d'azote, calculé à partir du nombre de résidus de tous les acides aminés et des amides; on a évidemment:

$$PM_I = \frac{100 \cdot 14 \cdot b}{a}$$

La précision de cette détermination est celle du dosage de l'azote total de la protéine; le nombre de résidus est forcément précis, puisqu'il s'agit de la somme de nombres entiers par définition.

Pour la deuxième détermination, soit c le nombre de chaînes peptidiques à extrémités libres (correspondant à $2c$ acides aminés en bout de chaîne) dans la protéine, on a:

$$PM_{II} = \sum \text{poids des résidus} + 18c$$

L'accord entre PM_I et PM_{II} ne peut avoir lieu que pour des valeurs bien déterminées du rapport *poids du résidu/poids d'azote* pour chacun des acides aminés considérés. Or ce rapport est susceptible d'assez grandes variations, comprises entre 2.77 pour l'arginine et 11.65 pour la tyrosine; ces variations font que si, dans une analyse, on trouve, par rapport à ce qui existe dans la protéine, plus d'un certain acide aminé et moins d'un autre, de telle sorte que l'azote total reste le même, l'accord entre PM_I et PM_{II} n'existe plus.

Dans le cas de l'unité élémentaire d'insuline de boeuf, on a les valeurs expérimentales suivantes:

Azote de la protéine, sèche et sans cendres, d'après CHIBNALL¹⁵: 15.54%.

Nombre d'atomes d'azote de la protéine, calculés à partir des résidus des acides aminés et des amides: 129.

$$PM_I = \frac{100 \cdot 14 \cdot 129}{15.54} = 11\,622$$

Somme des poids des résidus, compte tenu de 12 NH₂ remplaçant autant de OH: 11.383.

Nombre de chaînes peptidiques à extrémités libres, d'après SANGER¹⁸:

$$PM_{II} = 11\,383 + 72 = 11\,455$$

$$PM_I - PM_{II} = 167 \text{ soit } 1.4\%$$

Cette différence est due probablement à l'existence, dans la molécule d'insuline, d'une certaine quantité d'eau, 9 molécules par unité d'insuline, que les méthodes habituelles de dessiccation sont incapables d'éliminer, et qui est vraisemblablement de l'eau "de constitution".

Quant à la présence d'un résidu supplémentaire de proline, dont il y aurait alors 3 résidus comme le calcule TRISTRAM au lieu de 2 comme nous le trouvons, on voit facilement qu'elle ne modifierait guère la différence en question.

Nous admettons donc que le poids moléculaire de l'unité d'insuline est de 11 620. Cette valeur est de 3.2% inférieure à celle de 12 000 trouvée en faisant la moyenne de l'ensemble des valeurs calculées à partir des données analytiques correspondant à chacun des acides aminés. Il est évident qu'il n'y a là aucune contradiction, mais, au contraire, une précision.

Nous sommes heureux de remercier ici DR J. P. GREENSTEIN qui nous a aimablement offert les acides aminés L utilisés comme références dans les dosages microbiologiques, et MELLE T. SÉJOURNÉ qui a effectué ces dosages.

RÉSUMÉ

La méthode, décrite précédemment, de séparation chromatographique des acides aminés en quatre groupes: basique, acide, neutre aromatique et neutre non aromatique, a été appliquée à l'étude de la composition de l'insuline de boeuf. Chacun des acides aminés a été dosé dans chacun des groupes. Les résultats obtenus sont en excellent accord avec ceux de CHIBNALL et de TRISTRAM, ce qui montre la validité, au point de vue quantitatif comme au point de vue qualitatif, de la méthode de séparation en question. Les seules différences concernent l'acide glutamique et la leucine dont on trouve ici un résidu de plus et la proline dont on trouve ici un résidu de moins.

Une méthode de dosage de la proline a été indiquée; elle est basée sur la chromatographie de partage sur papier, avec révélation par l'isatine, au lieu de ninhydrine. Les taches bleues obtenues se prêtent bien à des mesures de surfaces.

La formule brute de l'unité élémentaire d'insuline apparaît comme étant: Gly, Ala, Sér, [(Cy.S)₂], Thr, Val, Leu, Ileu, Pro, Phe, Tyr, Asp, Glu, (NH₂)₁₂, Lys, His, Arg.

Le poids moléculaire de l'unité élémentaire d'insuline, calculé à partir du nombre d'atomes d'azote et de la proportion d'azote total de la protéine est de 11 620. Il ne diffère que de 1.4% de celui que l'on peut calculer à partir des résidus des acides aminés constituant la molécule, compte tenu des 8 acides aminés qui forment les extrémités des 4 chaînes peptidiques. Cette légère différence, supérieure à l'erreur probable du dosage de l'azote total, est vraisemblablement due à l'existence, dans l'insuline, d'eau de constitution dont l'élimination n'est guère possible par les méthodes habituelles de séchage.

SUMMARY

The chromatographic separation method of amino acids in four groups: *i.e.*, basic, acid, neutral aromatic and neutral non aromatic ones, was applied to study the composition of insulin. Each amino acid in each of these groups has been determined. The results obtained are in excellent agreement with those of CHIBNALL and of TRISTRAM, demonstrating hereby the validity, from a qualitative and a quantitative point of view, of the separation method concerned.

The only discrepancies found concern glutamic acid and leucin, of which one extra residue was found, and prolin of which one less was found. A determination method for prolin was indicated; it is based on partition chromatography on paper with development by isatin instead of ninhydrin. The area of the blue spots can easily be measured.

The empirical formula of the insulin unit appears to be:

Gly₇, Ala₆, Ser₆ [(CyS)₂]₆, Thr₂, Val₂, Leu₁₃, Ileu₂, Pro₂, Phe₆, Tyr₈, Asp₈, Glu₁₆ (NH₂)₁₂, Lys₂, His₄, Arg₂.

The molecular weight of an insulin element as calculated from the number of nitrogen atoms and the proportion of total nitrogen is 11 620. It differs by only 1.4% from the value calculated from the amino acid residues of the molecule, if the 8 amino acids which form the end of the 4 peptide chains are taken into account. This slight difference, superior, however, to the probable error of the total nitrogen determination, is likely to be due to the presence, in insulin, of bound water which cannot be eliminated by the usual drying methods.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zusammensetzung von Ochseninsulin wurde mit Hilfe der früher beschriebenen chromatographischen Trennungsmethode von Aminosäuren in vier Gruppen, basische, saure, neutrale aromatische und neutrale nicht aromatische, untersucht. In jeder dieser Gruppen wurde jede einzelne Aminosäure bestimmt. Die Ergebnisse stimmen ausgezeichnet mit derjenigen von CHIBNALL und von TRISTRAM überein, was die Gültigkeit der erwähnten Methode im qualitativen und im quantitativen Sinne darlegt. Die einzigen Unterschiede betreffen die Glutaminsäure und das Leucin von denen wir je einen Rest mehr fanden, und das Prolin, von dem wir einen Rest weniger fanden. Eine Bestimmungsmethode für Prolin wurde angegeben; sie gründet sich auf die Verteilungschromatographie an Papier unter Verwendung von Isatin statt Ninhydrin als Entwickler. Die blauen Flecke lassen sich gut ausmessen.

Es ergibt sich die folgende Bruttoformel für eine Elementareinheit Insulin:

Gly₇, Ala₆, Ser₆ [(CyS)₂]₆, Thr₂, Val₂, Leu₁₃, Ileu₂, Pro₂, Phe₆, Tyr₈, Asp₈, Glu₁₆ (NH₂)₁₂, Lys₂, His₄, Arg₂.

Für das Molekulargewicht einer Insulinelementareinheit findet man 11 620, wenn man die Anzahl der Stickstoffatome und den Gesamtstickstoffgehalt der Rechnung zu Grunde legt. Dieser Wert weicht nur um 1.4% von dem aus den Aminosäureresten der Molekel berechneten Werte ab, wenn die 8 Aminosäuren, welche die Enden der 4 Peptidketten bilden, mit berücksichtigt werden. Dieser geringe Unterschied, der aber doch grösser ist als der bei der Gesamtstickstoffbestimmung zu erwartende Fehler, muss wahrscheinlich auf das Vorkommen von Konstitutionswasser im Insulin zurückgeführt werden, das mit den üblichen Trocknungsmethoden nicht entfernt werden kann.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ CL. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- ² G. R. TRISTRAM, *Biochem. J.*, 40 (1946) 721.
- ³ R. B. FISHER, D. S. PARSONS ET G. A. MORRISON, *Nature*, 161 (1948) 764.
- ⁴ R. C. BRIMLEY, *Nature*, 163 (1949) 215.
- ⁵ H. T. MACPHERSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 470.
- ⁶ CL. FROMAGEOT ET R. COLAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 417.
- ⁷ O. FOLIN ET A. D. MARENZI, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 89.
- ⁸ B. ALEXANDER, G. LANDWEHR ET A. M. SELIGMAN, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 51.
- ⁹ T. WINNICK, *J. Biol. Chem.*, 142 (1942) 461.
- ¹⁰ B. S. SCHWEIGERT, J. M. MCINTYRE, C. A. ELVEHJEM ET F. M. STRONG, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 183.
- ¹¹ O. FOLIN ET A. D. MARENZI, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 103.
- ¹² CL. FROMAGEOT ET M. PRIVAT DE GARILHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1949) 509.
- ¹³ W. GRASSMANN ET K. VON ARNIM, *Ann. Chem. Justus Liebig's*, 519 (1935) 192.
- ¹⁴ E. BRAND, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 47 (1946) 187.
- ¹⁵ A. C. CHIBNALL, *J. Intern. Soc. Leather Trades' Chemists*, 30 (1946) 1.
- ¹⁶ A. C. CHIBNALL, M. W. REES ET E. F. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 37 (1943) 354.
- ¹⁷ S. E. DARMON, G. B. B. M. SUTHERLAND ET G. R. TRISTRAM, *Biochem. J.*, 42 (1948) 508.
- ¹⁸ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.

Reçu le 27 juillet 1949