

Reçu le 30 Mars 1970

# Possibilités d'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des acides aminés libres des plantes

**LUIS CAMPOS**

Assistant de l'Institut Superior de Agronomia, Lisboa

**MARCEL RENARD**

Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, Gembloux

Professeur ordinaire de la Chaire de Chimie Générale et Organique

**MICHEL SEVERIN**

Assistant de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, Gembloux

## RESUMO

Estudámos neste trabalho a preparação dos ésteres n-butil-N-trifluoroacetilados. Aplicámos seguidamente o método à análise dos aminoácidos livres de algumas sementes e comparámos os resultados com os da cromatografia em papel.

Observámos na maioria dos casos uma boa concordância e pudemos justificar as divergências aparentes observadas.

Este estudo comparativo permitiu-nos pôr em evidência a existência de aminoácidos especiais revelados por cromatografia em fase gasosa, alguns dos quais podem corresponder a manchas não identificadas nos cromatogramas em papel.

Concluimos que apesar das restrições que assinalamos a cromatografia em fase gasosa pode prestar serviços apreciáveis na análise dos aminoácidos livres das plantas, especialmente se os resultados obtidos forem comparados com os da análise por cromatografia em papel.

## I -- INTRODUCTION

### 1. *CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES*

Le rôle fondamental que jouent les acides aminés dans le métabolisme des plantes est bien connu. Contrairement aux animaux, les végétaux supérieurs sont capables de synthétiser tous les acides aminés dont ils ont besoin.

Outre les acides aminés libres qui sont aussi des constituants principaux des protéines, on a découvert dans le règne végétal, au cours des dernières années, de nouveaux acides aminés libres qui ne le sont pas.

Les nouveaux acides aminés sont pour la plupart des homologues ou des dérivés des acides aminés des protéines. On rencontre cependant dans ces composés des structures particulières qui sont rares dans les substances naturelles.

L'importance de ces acides aminés dans la biosynthèse et la dégradation des substances azotées n'est pas encore bien connue, mais il est certain que quelques-uns des constituants de ce groupe de substances interviennent dans plusieurs phases du métabolisme cellulaire (FOWDEN, 1962a et 1964). On sait aussi qu'il y a des liaisons étroites entre les acides aminés libres et les  $\alpha$ -cétoacides, et par conséquent avec les phénomènes de transamination (FOWDEN et WEBB, 1955).

La répartition de ces acides aminés libres dans les différents milieux végétaux est très variable. Quelques-uns d'entre eux se trouvent dans un grand nombre d'espèces. Par contre la présence de certains est limitée à quelques espèces ou même est caractéristique d'une espèce donnée. Leur détermination permet dans certains cas la résolution de problèmes taxonomiques difficiles.

Sa concentration est aussi fort variable, et dans une même plante la concentration d'un acide donné peut d'ailleurs varier d'un organe à l'autre, et en fonction du degré de développement et de maturité de la plante.

L'introduction des techniques chromatographiques a révolutionné la chimie organique des substances naturelles. La technique chromatographique de partage de Martin et Synge a été appliquée pour la première fois en 1941, précisément à la séparation d'acides aminés. DENT, STEPKA et STEWARD (1947) ont appliqué la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier à l'étude des composés azotés solubles des

végétaux. La chromatographie sur colonne de résines échangeuses d'ions, introduite par STEIN et MOORE (1948), a permis de séparer et de purifier les acides aminés et de doser les 20 acides aminés des protéines. Les résultats obtenus par ces techniques ont été complétés par l'utilisation de l'électrophorèse et de la chromatographie électrophorèse continue sur papier et de la chromatographie et électrophorèse sur couche mince.

Enfin, les progrès réalisés dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse, notamment l'amélioration de l'appareillage et l'utilisation de nouvelles phases stationnaires, ont permis son application à l'analyse des acides aminés. Les méthodes d'analyse utilisant cette technique sont actuellement en pleine évolution.

Dans ce travail, nous nous proposons d'appliquer la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des acides aminés libres des plantes et de comparer les résultats obtenus avec ceux de la chromatographie sur papier.

En outre nous essayerons de mettre en évidence les principales difficultés que l'on peut rencontrer dans l'identification et dans l'analyse quantitative des acides aminés libres des plantes par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse des acides aminés libres et protéiques par cette technique, plus rapide et plus sensible, constitue une contribution importante aux progrès de la génétique, de la biochimie des protéines, des sciences agricoles, de la nutrition et de l'investigation médicale.

## 2. ANALYSE DES ACIDES AMINÉS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

### 2.1. *Considérations générales.*

Les difficultés de l'analyse des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) résident dans les caractéristiques spécifiques de ces composés — faible volatilité, polarité due aux groupements  $-COOH$  et  $-NH_2$ , grande variété de structures et dégradation à température élevée.

Par conséquent, il est nécessaire de transformer les acides aminés en dérivés volatils stables à températures élevées. Les grandes différences de structure des acides aminés (acides aminés polycarboxyliques, polyaminés, hydroxylés, cycliques, etc.) rend difficile le choix du dérivé; de nombreux travaux sont consacrés à ce sujet.

Les dérivés étudiés jusqu'à présent peuvent être classés en 4 groupes principaux: les dérivés obtenus par dégradation des acides aminés, les dérivés formés par cyclisation, ceux formés par modification du groupe aminé ou carboxylique, et les doubles dérivés. Ces derniers sont ceux qui semblent le mieux répondre aux conditions de l'analyse.

## 2.2. *Résumé historique.*

Depuis 1956 de nombreux dérivés ont été étudiés en vue de leur application à la séparation des acides aminés par CPG.

Les premières séparations ont été effectuées par HUNTER, DIMICK et CORSE (1956), qui ont transformé les acides aminés en aldéhydes par la ninhydrine. BAYER, REUTHER et BORN (1957) ont séparé les esters méthyliques de quelques acides aminés simples sur une colonne de silicone et de caproate de sodium. L'année suivante BAYER (1958) a obtenu des séparations d'esters N-trifluoroacétylés, et YOUNGS (1959) a réalisé la séparation des esters n-butyliques N-acétylés de la glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine et proline.

Depuis lors de nombreux travaux ont été consacrés à l'analyse des acides aminés par CPG. SEVERIN et RENARD (1963) ont transformé les acides aminés en nitriles par l'action d'hypochlorite de soude; cette méthode a été appliquée par DARDENNE et Coll. (1969) à la séparation d'acides aminés isomères. DARBRE et Coll. (1965a, 1965b et 1967) et BLAU et Coll. (1963, 1965a, 1965b et 1967) ont étudié les esters amyliques N-trifluoroacétylés et RÜHLMANN et Coll. (1961, 1963 et 1965) les esters triméthylsilyliques des acides aminés N-triméthylsilylés. Aus cours d'une série de travaux importants GERHKE et Coll. ont amélioré la synthèse et la séparation des esters n-butyliques N-trifluoroacétylés.

Les travaux les plus récents visent surtout l'application des méthodes déjà décrites dans la littérature à l'analyse quantitative.

## 2.3. *Les esters butyliques des acides aminés N-trifluoroacétylés.*

Parmi les méthodes utilisées pour l'obtention de dérivés plus volatils qui permettent l'analyse des acides aminés par CPG, les plus étudiés sont ceux qui bloquent simultanément les groupements  $-NH_2$  et  $-COOH$ .

La méthode de la N-trifluoroacétylation a été introduite dans l'étude des acides aminés car les esters ainsi obtenus ont une volatilité convenable et peuvent ainsi être rapidement séparés par CPG.

La première séparation d'acides aminés sous forme d'esters butyliques N-trifluoroacétylés (TAB) a été réalisée par ETTRE (1962) sur des colonnes capillaires de 21 à 45 m contenant du QF-1.

ZOMZELY, MARCO et EMERY (1962) ont séparé 19 dérivés d'acides aminés protéiques.

MAKISUMI, NICHOLLS et SAROFF (1963) ont étudié principalement la séparation des dérivés de la leucine sur NPGA 2 % sur Chromosorb W à 142° et 181° C.

MARCUCCI et Coll. (1965) ont utilisé une résine (Amberlite 15 et Dowex 50x4) comme catalyseur d'esterification avec le butanol. Ils ont comparé différentes phases stationnaires, les meilleures séparations ayant été obtenues avec la NPGS, la EGSS-X et le Carbowax 20M. Les auteurs ont aussi appliqué cette méthode à la séparation des dérivés de la proline dans les protéines.

STEFANOVIC et WALKER (1967) ont montré que l'ordre d'élution des acides aminés dépend fortement du rapport phase stationnaire - support, en raison de l'interaction entre les groupements polaires des acides aminés et ceux de la phase stationnaire. Ils ont essayé d'améliorer la séparation en faisant varier ce rapport. Ils ont séparé les esters n-butyliques N-trifluoroacétylés sur EGA 0,65 %, et ont appliqué ces résultats à des hydrolysats de protéines.

Les travaux de PFEIFFER et Coll. (1967) ont eu pour but de comparer les séparations des esters amyliques, butyliques et méthyliques.

L'étude la plus approfondie des TAB a été réalisée par GEHRKE et Coll. (1965 à 1968), LAMKIN et GEHRKE (1965) et ROACH et GEHRKE (1969a et 1969b).

Les dérivés ont d'abord été préparés de la façon suivante: une solution de méthanol contenant 1,2 meq de HCl anhydre était ajoutée au mélange d'acides aminés. Après 30 minutes, le méthanol en excès était éliminé sous vide à 60° C. Une solution de butanol-HCl était alors ajoutée, le mélange chauffé pendant 3 h. à 100° C et l'excès de butanol éliminé sous vide. Les chlorhydrates d'esters étaient alors trifluoroacétylés par une solution d'anhydride trifluoroacétique dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Après 2 h. de réaction à 25° C on éliminait l'anhydride et le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; les esters butyliques N-trifluoroacétylés ainsi formés étaient alors dissous dans  $\text{CHCl}_3$  anhydre.

La transformation initiale en esters méthyliques suivie d'une transesterification au butanol se révélait nécessaire en raison de l'insolubilité de quelques acides aminés basiques dans le butanol.

Dans ces conditions le tryptophane donnait lieu à la formation de deux dérivés (mono et diacétylés) et l'arginine se transformait en un sel trifluoroacétique non volatil qui se dégradait partiellement en ornithine au cours de l'analyse.

Pour ces raisons, les auteurs ont introduit quelques modifications dans la méthode initiale d'acylation. Celle-ci est réalisée à 150 °C pendant 5 min. en tube scellé. Cette méthode d'acylation permet d'obtenir des dérivés complètement acétylés pour les 20 acides aminés des protéines. L'injection directe sur la colonne (injecteur en verre) élimine les dégradations au moment de l'injection.

Les auteurs ont comparé différentes phases stationnaires (polyesters, silicones, et d'autres) de façon à obtenir une séparation complète des 20 acides aminés des protéines. Aucune de ces phases ne résout entièrement le problème, et des phases stationnaires mixtes ou en série ont été testées.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une phase mixte de DEGS - EGSS-X 0,75-0,25 % sur Chromosorb W lavé à l'acide, utilisée avec programmation de température de 67° C à 218° C.

Les réponses molaires relatives à l'acide glutamique ont été obtenues pour 19 acides aminés, et le rendement des dérivés a été calculé et s'est avéré supérieur à 97 %.

Cette méthode a été appliquée à l'analyse d'hydrolysats de protéines (gluten, serum, K-caséine).

Après avoir constaté une résolution incomplète des 20 acides aminés, GERHKE, ZUMWALT et WALL (1968) ont étudié les principaux facteurs qui peuvent influencer la séparation. La présence d'eau pouvant provoquer l'hydrolyse des dérivés, ils ont pensé améliorer l'efficacité de la colonne en enlevant complètement l'eau du support. Dans ce but, les auteurs ont soumis le support à l'action de la chaleur et ils ont obtenu une amélioration des séparations sur les colonnes dont les supports avaient été chauffés entre 450° et 600° C.

Les auteurs ont constaté que la colonne d'EGA sur Chromosorb G chauffé à 600° C pendant 15 h. était celle qui donnait les meilleurs résultats pour l'analyse d'un mélange de 17 acides aminés. Pour l'arginine, l'histidine et la cystine, ils ont testé la DC-550 et l'OV-17. Celle-ci s'est révélée plus efficace. Toutefois, le dérivé diacétylé de l'histidine, peu stable, se transformait en monoacétylé. Une injection de butanol

immédiatement après l'injection des dérivés permettait la conversion quantitative du dérivé diacétylé en monoacétylé. Cependant, les résultats obtenus par cette technique dépendaient d'un certain nombre de facteurs difficiles à contrôler. Pour cette raison, ROACH, GEHRKE et ZUMWALT (1969) ont mis au point trois méthodes différentes pour la séparation et l'analyse quantitative de l'histidine. Deux de ces méthodes utilisent les dérivés n-butyl N-TFA. Dans la première, le dérivé diacétylé est transformé en monoacétylé par l'élimination de l'excès d'anhydride trifluoroacétique; dans la seconde l'histidine est analysée sous forme de dérivé diacétylé, formé dans la colonne chromatographique par l'injection de 4  $\mu$ l d'anhydride trifluoroacétique; la séparation est effectuée sur OV-22. Dans la troisième méthode l'histidine est convertie en dérivé triméthylsilylé (TMS) par la bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) et analysée sur une colonne mixte de 3 % d'OV-17 et 1,5 % d'OV-22. L'arginine, le tryptophane et la cystine sont aussi analysés sous forme de dérivés TMS (Arg<sub>4</sub>, Try<sub>3</sub>, Cys<sub>4</sub>) dans les mêmes conditions.

GEHRKE et Coll. ont obtenu une séparation complète de 20 acides aminés des protéines en utilisant pour 16 acides aminés soit une colonne d'EGA 0,325 % sur Chromosorb G chauffé et lavé à l'acide (a.w.), soit une colonne d'EGA 0,65 % sur Chromosorb W 60-80 mesh chauffé à 140° C pendant 12 h.; les 4 acides aminés restants sont séparés sur une colonne d'OV-17 1,5 % sur Chromosorb GHT, a. w. Les réponses molaires relatives à l'acide glutamique se sont avérées satisfaisantes.

HERB (1968) et GEETS (1969) ont considéré que l'application de la méthode quantitative de Gehrke aux milieux biologiques nécessite de grandes précautions.

DEL FAVERO et Coll. (1969) ont étudié et comparé les réponses molaires absolues obtenues avec les TAM (esters n-méthyl-trifluoroacétylés), TAB et TAP (esters n-propyl-trifluoroacétylés).

Plus récemment, les études sur les esters triméthylsilyliques de RÜHLMANN et GIESEKE (1961), RÜHLMANN et MICHAEL (1963 et 1965), et KLEBE et Coll. (1966) ont été repris par GEHRKE, NAKAMOTO et ZUMWALT (1969). Les auteurs estiment que ces dérivés sont plus stables que les TAB et conviendraient mieux pour l'analyse quantitative.

Actuellement, d'autres dérivés sont étudiés. Ainsi, RODA et ZAMORANI (1970) utilisent les phénylthiohydantoïnes trifluoroacétylées.

## II — PARTIE EXPERIMENTALE

### 1. *Essais préliminaires.*

#### 1.1. *Protocole des essais.*

En vue d'apprécier les possibilités de l'application de la méthode mise au point par Gehrke et Stalling à l'analyse des acides aminés libres des plantes, nous avons d'abord étudié la séparation de mélanges complexes d'acides aminés purs, protéiques ou trouvés à l'état libre dans des différents milieux biologiques, et nous avons déterminé les réponses molaires de chacun de ces acides.

#### 1.2. *Réactifs.*

Le méthanol, le butanol et le chlorure de méthylène proviennent de la firme *Merck* et l'anhydride trifluoroacétique de la firme *Fluka* (91720).

Les acides aminés utilisés dans les essais préliminaires proviennent de *Mann Research Laboratories* sauf: l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique et l'homosérine (*Nutritional Bioch. Corp.*); la norleucine, la leucine et la glutamine (*The British Drug House*); la  $\beta$ -alanine et l'asparagine (*E. Marck*); l'acide glutamique (*Riedel de Haën*); l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (*Theodor Schuchardt*); la S-méthylcystéine et la phénylalanine (*Calif. Found. for Biol. Research*); l'acide pipécolique, l'acide 5-OH-pipécolique et la  $\beta$ -cyanoalanine (*Calbiochem*). Les acides  $\gamma$ -OH- $\gamma$ -méthylglutamique, G<sub>1</sub>\*, G<sub>2</sub>\* et la  $\gamma$ -glutamyl-S-méthylcystéine proviennent de milieux naturels et ont été isolés aux laboratoires de Chimie Organique de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'État, Gembloux.

L'HCl pur anhydre a été produit au laboratoire en faisant réagir H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sur NH<sub>4</sub>Cl dans un appareil de Kipp et en le séchant ensuite sur H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et *sikkon* bleu (*Fluka*).

Les solutions de méthanol-HCl et butanol-HCl 1,25 N ont été préparées en faisant barboter l'HCl gazeux anhydre dans le méthanol (butanol) au moyen d'un tube capillaire jusqu'à ce que la solution contienne environ 5,0 g HCl/100 ml. La solution a été alors titrée par NaOH 1 N.

---

\* Deux stéréoisomères de l'acide  $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -méthylglutamique isolés pour la première fois aux laboratoires de Chimie Organique de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'État, Gembloux (G. DARDENNE).



Le stéarate de butyle utilisé comme étalon interne a été préparé suivant la méthode décrite par VOGEL (1962) pour la préparation de l'acétate de butyle.

### 1.3. Matériel.

Nous avons utilisé des ballons à réaction de 100 ml en forme de poire avec une embochure B.24, munie de tubes exsiccateurs à  $\text{CaCl}_2$ ; des agitateurs magnétiques *J. K.*; un bain d'huile en acier inoxydable chauffé par une résistance à thermostat *Haake K21*; des tubes à hydrolyse; et l'évaporateur rotatif *Büchi*.

#### 1.3.1. Appareillage chromatographique.

Le Chromatographe est un *Varian Aerograph Hi-Fy 600D* à ionisation de flamme équipé du programmeur de température modèle 326, d'un enregistreur *Honeywell* -0,2-1 mV et de l'intégrateur électronique *Hewlett Packard* 3370 A; les injections ont été faites avec des seringues *Hamilton* de 10  $\mu\text{l}$ .

#### 1.3.2. Colonnes.

Nous avons utilisé des colonnes en verre de 1,5 m  $\times$  1/8", l'une remplie d'une phase stationnaire mixte de DEGS-EGSS-X 0,25-0,75 % w/w sur Chromosorb W 60-80 mesh lavé à l'acide (a.w), l'autre d'EGA 0,325 % sur Chromosorb G 60-80 mesh lavé à l'acide et chauffé à 600° C. Les phases DEGS et EGA, et les supports proviennent de *Varian Aerograph*, et l'EGSS-X d'*Applied Science Laboratory*.

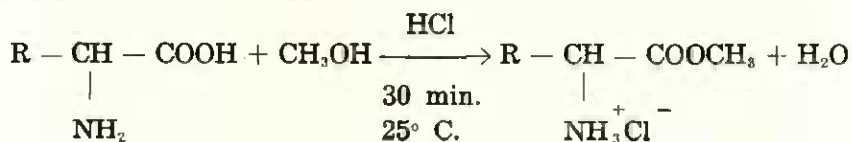
Le Chromosorb G a été chauffé pendant 15h. à 600° C. L'imprégnation a été réalisée en dissolvant dans un solvant approprié ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ou acetone) une quantité déterminée de phase stationnaire, et en additionnant cette solution au support dans le rapport choisi, le solvant recouvrant tout le support. Après avoir mélangé le tout le solvant a été évaporé sous vide à l'évaporateur rotatif à la température de 60° C. Les traces de solvant ont été enlevés par un chauffage à 100° C pendant 2 h.

1.4 Synthèse des esters *n*-butyliques *N*-trifluoroacétylés.

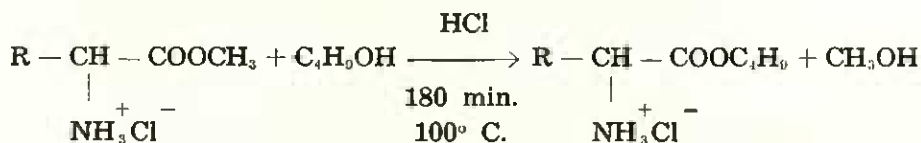
## 1.4.1. Réactions.

La synthèse de ces esters est effectuée en trois étapes:

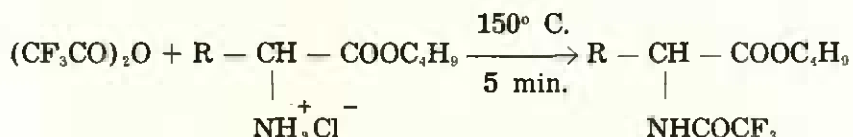
a — Transformation des acides aminés en esters méthyliques obtenus sous forme de chlorhydrates:



b — Transesterification des esters méthyliques:



c — Formation des esters *n*-butyliques *N*-trifluoroacétylés par acylation des esters butyliques au moyen de l'anhydride trifluoroacétique:



La formation des esters méthyliques s'avère nécessaire seulement pour permettre la solubilisation de quelques acides aminés (arginine, histidine, cystine) dans le butanol.

## 1.4.2. Préparation.

Nous avons suivi la technique de Gehrke et Coll. pour la transformation des acides aminés en TAB.

a) Esterification des acides aminés par le  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

60 mg du mélange anhydre des acides aminés sont dissous dans 10 ml de méthanol - HCl 1,25 N. Un tube à  $\text{CaCl}_2$  est adapté au ballon,

et la solution agitée pendant 30 minutes à température ambiante. Le méthanol en excès est éliminé à l'évaporateur rotatif à 70° C.

b) *Transesterification des chlorhydrates des esters méthyliques.*

10 ml de butanol - HCl 1,25 N et 2 ml de la solution de l'étalon interne (stéarate de butyle) sont ajoutés aux chlorhydrates. Un tube à CaCl<sub>2</sub> est adapté au ballon et celui-ci chauffé dans un bain de paraffine à 100° C pendant 180 minutes avec agitation. L'HCl en excès est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif à 70° C.

c) *Acylation des chlorhydrates des esters butyliques.*

4 ml d'une solution à 25 % d'anhydride trifluoroacétique dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont ajoutés aux chlorhydrates, et la solution agitée pendant 15 minutes à la température ambiante. Une partie de la solution est ensuite transférée dans un tube à hydrolyse et chauffée à 150° C dans un bain de paraffine pendant 5 minutes.

1.5. *Analyse des mélanges d'acides aminés purs.*

Nous avons utilisé pour la séparation des acides aminés des protéines les colonnes décrites en 1.3.2. en faisant varier les débits de gas porteur et la programmation de température de façon à améliorer les séparations.

Les meilleurs chromatogrammes ont été obtenus au moyen de la colonne mixte de DEGS — EGSS-X avec un débit d'azote de 20 ml/min. et une programmation de température de 4°/min.; et de la colonne d'EGA avec un débit d'azote de 20 à 30 ml/min. et une programmation de température de 2°/min.

Nous avons ensuite étudié la séparation sur ces mêmes colonnes de 15 acides aminés spéciaux: l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique, la  $\beta$ -alanine, la norleucine, la S-méthylcystéine, l'acide pipécolique, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique, l'homosérine, l'acide 5-OH-pipécolique, l'asparagine, la glutamine, la  $\beta$ -cyanoalanine, l'acide  $\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -méthylglutamique, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, et l'ornithine.

Les températures de rétention et les réponses molaires relatives (r.m.r.) par rapport au stéarate de butyle des acides aminés séparés sur les deux colonnes dans les mêmes conditions d'analyse sont reprises dans le Tableau I.

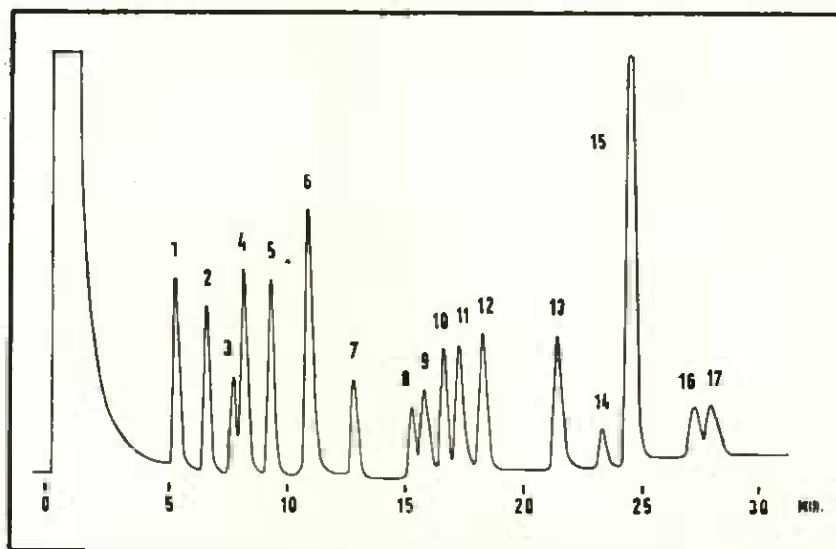


Fig. 1

*Analyse par chromatographie en phase gazeuse d'un mélange d'acides aminés protéiques. Colonne d'EGSS-X — DEGS*

- |                |                         |
|----------------|-------------------------|
| 1 — Alanine    | 10 — Hydroxyproline     |
| 2 — Valine     | 11 — Phénylalanine      |
| 3 — Glycine    | 12 — Acide aspartique   |
| 4 — Isoleucine | 13 — Acide glutamique   |
| 5 — Leucine    | 14 — Tyrosine           |
| 6 — Proline    | 15 — Stéarate de butyle |
| 7 — Sérine     | 16 — Lysine             |
| 8 — Cystéine   | 17 — Tryptophane        |
| 9 — Méthionine |                         |

1.6. *Conclusions.*

L'ensemble des essais réalisés sur les 35 acides aminés permet de tirer les conclusions suivantes:

De façon générale les rendements de synthèse paraissent convenables et assez reproductibles.

TABLEAU I

Acides aminés	DEGS — EGSS-X		EGA	
	Temp. rétention	R. M. R.	Temp. rétention	R. M. R.
Alanine	107° C	0,35	99° C	0,31
Valine	112	0,49	104	0,43
Glycine	116	0,26	109	0,10
Isoleucine	117	0,52	110	0,42
Leucine	121	0,50	114	0,41
Thréonine	128	0,45	119	0,23
Proline	129	0,37	120	0,12
Sérine	134	0,37	124	0,26
Cystéine	145	0,29	139	0,10
Méthionine	147	0,35	145	0,10
Hydroxyproline	151	0,47	147	0,34
Phénylalanine	153	0,50	148	0,15
Acide aspartique	157	0,51	150	0,34
Acide glutamique	169	0,58	165	0,34
Tyrosine	178	0,16	176	0,19
Tryptophane	198	0,20	(a)	(b)
Lysine	194	0,27	(a)	(b)
Ac. $\alpha$ -aminobutyrique	110	0,27	102	0,15
$\beta$ -alanine	121	0,32	114	(b)
Norleucine	125	0,48	115	0,17
Ac. pipécolique	125	(b)		
S-méthylcystéine	134	0,38	129	0,12
Ac. $\gamma$ -aminobutyrique	138	0,35	132	0,13
Homosérine	145	0,28	138	(b)
Ac. 5-OH-pipécolique	148	(b)		
Asparagine	157	0,30	150	0,16
$\beta$ -cyanoalanine	155	(b)		
Glutamine	169	(b)	165	0,18
$\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -méthylglutamique	176	0,27	174	(b)
G <sub>1</sub>	176	(c)	169	(c)
G <sub>2</sub>	180	(c)	(c)	(c)
Ornithine	186	0,27	(d)	(d)

(a) Elués à température supérieure à la température limite de la colonne.

(b) Non déterminé.

(c) Non déterminé en raison de la quantité trop faible de substance.

(d) Non élué.

Les dérivés n-butyl N-trifluoroacétylés de tous les acides aminés subissent une dégradation variable dans le temps (GEETS, 1969). Par conséquent, il est indispensable d'injecter les extraits immédiatement après la synthèse.

L'apparition de pics fantômes exige une grande prudence dans l'interprétation des résultats qualitatifs.

De l'étude des températures de rétention des 32 acides aminés étudiés (Tableau I), on peut voir qu'il n'est pas possible de séparer un mélange complet de ces acides sur une seule colonne. Ainsi par exemple, sur la colonne d'EGSS-X—DEGS, la sérine et la S-méthylcystéine ont pratiquement la même température de rétention; c'est également le cas pour les dérivés de la leucine et de la  $\beta$ -alanine. L'arginine, l'histidine et la cystine ne sont pas élués sur les deux colonnes étudiées.

Pratiquement les colonnes d'EGSS-X—DEGS 0,25 %-0,75 % ou EGA 0,325 % permettent la séparation convenable de 17 des 20 acides aminés protéiques. Mais la complexité des chromatogrammes obtenus avec les 32 acides aminés étudiés met en évidence les difficultés de séparation que l'on doit rencontrer dans l'analyse des acides aminés libres des plantes. Etant donné le grand nombre d'acides aminés libres existants, il est clair que l'identification complète et certaine de tous les acides aminés libres d'un mélange biologique complexe est impossible à partir d'un chromatogramme obtenu par CPG. Nous pensons qu'une séparation préalable en groupes au moyen de résines échangeuses d'ions pourrait dans certains cas aider à résoudre une partie des problèmes d'identification. Mais on enlève alors à la chromatographie en phase gazeuse l'un des principaux avantages de la méthode par rapport aux autres techniques chromatographiques: la rapidité d'analyse.

Des réponses molaires relatives données sur le Tableau I, on voit que la colonne d'EGSS-X—DEGS est la plus intéressante pour l'analyse quantitative; l'EGA est utilisée seulement pour la confirmation de quelques résultats qualitatifs et la séparation de la paire sérine—S-méthylcystéine, qui n'est pas séparée sur l'EGSS-X—DEGS.

De plus nous avons remarqué que l'asparagine, la glutamine et quelques peptides présents dans certains extraits de plantes (par exemple la  $\gamma$ -glutamyl-S-méthylcystéine dans *Phaseolus*) sont presque complètement hydrolysés au cours de la synthèse du dérivé. Par conséquent, lorsque ces composés sont présents dans les extraits, on obtient

un seul et même dérivé pour les paires acide aspartique — asparagine et acide glutamique — glutamine, et les acides aminés constitutifs des peptides s'ajoutant à chaque acide aminé libre correspondant, l'identification de ces composés hydrolysables est impossible par CPG et de plus cette hydrolyse fausse les résultats quantitatifs.

#### En conclusion:

Nous pensons que la CPG des esters n-butyl N-trifluoroacétylés est applicable non seulement aux acides aminés des protéines, mais également à l'étude des acides aminés libres des extraits de plantes. Cependant dans ce dernier cas, l'interprétation des résultats tant qualitatifs que quantitatifs demande de la part de l'utilisateur une grande prudence.

Etant donné le nombre élevé d'acides aminés libres découverts et présents dans les extraits de plantes, l'analyse qualitative est rendue difficile par la présence possible d'acides aminés différents mais ayant des temps de rétention identiques.

La présence possible dans les extraits de composés hydrolysables (asparagine, glutamine, dipeptides) est susceptible de fausser les résultats quantitatifs.

## 2. Application à l'analyse des acides aminés libres des plantes.

### 2.1. Protocole expérimental.

Nous avons appliqué à l'étude des acides aminés libres des plantes la méthode de transformation des acides aminés purs en dérivés n-butyl N-trifluoroacétylés. Nous avons comparé les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse avec ceux obtenus par chromatographie sur papier en vue d'apprécier les possibilités et les avantages de la CPG dans l'identification et l'analyse quantitative des acides aminés libres des plantes.

### 2.2. Matériel biologique.

Nous avons utilisé dans cette étude des lots de graines provenant de l'«Estação de Ensaios de Sementes» de Lisbonne dont les espèces et variétés sont les suivantes: *Phaseolus vulgaris* L. (1441/69); *Vigna sinensis* (L.) Endl. (704/69); *Vicia faba* L. (1015/68); *Zea mays* L. (HV-16); *Oryza sativa* L. (Alório) et *Glycine soja* (L.) Merr. (Hark).

### 2.3. *Extraction des acides aminés libres des graines.*

Nous avons broyé au moulin à marteau 10 g de chaque lot de graines et nous avons agité les farines obtenues pendant deux heures avec de l'éthanol à 80° C. Un pourcentage final d'éthanol de 75 % a l'avantage de minimiser l'action des enzymes et d'empêcher l'extraction des protéines, pectines et substances à haut poids moléculaire. Il faut aussi veiller à ce que l'extraction soit complète car certains acides aminés (acides glutamique et aspartique, et tyrosine) sont difficilement solubles dans de telles conditions (DARDENNE et CASIMIR, 1968).

Les différents extraits alcooliques ainsi obtenus, contenant, outre les acides aminés, des substances organiques telles que des glucides, des polyols, des substances colorées et des sels minéraux, ont été filtrés sur papier SS 5951/2 et soumis à la purification sur colonne.

### 2.4. *Purification des extraits.*

Lorsqu'un extrait végétal doit être soumis à une analyse chromatographique, il est nécessaire d'éliminer les substances interférentes.

Les techniques décrites sont basées pour la plupart sur l'emploi de résines échangeuses d'ions. Nous avons suivi pour cette purification la méthode de THOMPSON et Coll. (1959). Elle consiste à fixer sur une résine échangeuse de cations, fortement acide, tous les acides aminés, peptides et cations. Les anions, les glucides et les substances non ionisées passent dans le filtrat. Le lavage de la résine par une solution tampon appropriée élue quantitativement les acides aminés, tandis que les cations minéraux restent fixés.

La purification des différents extraits a été effectuée sur colonne d'Amberlite IR 120 (forme H<sup>+</sup>, 100-120 mesh) de 50 cm de hauteur et 4 cm de diamètre. Après passage de l'extrait alcoolique sur la colonne, celle-ci a été lavée à l'eau jusqu'à l'élimination de l'alcool; les acides aminés retenus ont été élués par NH<sub>3</sub> 1 N. Le passage des acides aminés peut être suivi par la réaction à la ninhydrine.

À la fin de l'éluion le filtrat a été évaporé sous pression réduite à 60° C jusqu'à l'élimination des traces d'ammoniac, et le résidu repris par un minimum d'eau distillée.

Les chromatogrammes sur papier ont été obtenus à partir de cette solution.

En vue de satisfaire aux conditions de la synthèse et de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse les solutions ont été séchées sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> jusqu'à l'élimination complète de l'eau.



## 2.5. *Etude chromatographique.*

Nous avons comparé la répartition des acides aminés des extraits ainsi obtenus par chromatographie sur papier et par chromatographie en phase gazeuse.

### 2.5.1. Chromatographie sur papier.

Nous avons identifié par chromatographie bidimensionnelle sur papier les acides aminés libres des différentes graines.

Nous avons utilisé les solvants suivants:

1) n-butanol — acide formique — eau, dans les proportions 75 — 15 — 10 (v/v);

2) phénol saturé par un tampon phosphate-acide citrique de pH 4.2.

La séparation a été réalisée sur papier *Schleicher & Schull* 2043 b, en utilisant le sens rapide pour le développement au phénol.

Les figures 2, 4, 6, 8, 10 et 13 montrent les séparations obtenues pour les différentes graines.

Pour *Glycine soja* (*L.*) nous avons mené parallèlement une séparation par chromatodélectrophorèse afin de séparer les tâches des peptides présents de celles d'acides aminés connus (Fig. 14). Ainsi nous avons effectué une chromatographie avec le mélange butanol — acide formique — eau suivie d'une électrophorèse avec une solution d'acide acétique à pH 2,4 (GEHRLAXHE et RENARD, 1954).

### 2.5.2 Chromatographie en phase gazeuse.

#### 2.5.2.1. Synthèse des dérivés.

Les extraits provenant de la purification sur colonne ont été séchés en présence de  $P_2O_5$ , et les dérivés n-butyl N-trifluoroacétylés préparés à partir de quantités d'extrait comprises entre 10 mg et 30 mg suivant la méthode décrite en 1.4.2.

#### 2.5.2.2. Conditions de l'analyse.

Nous avons utilisé les mêmes conditions décrites en 1.5. pour l'analyse des acides aminés purs. Pour l'obtention des chromatogrammes des figures 3, 5, 7, 9, 11 et 15: colonne d'EGSS-X — DEGS sur Chromosorb W a.w. 60-80 mesh comme phase stationnaire; température initiale de 75° C à 80° C; programmation de 4°/min; injecteur à 245° C; débit d'azote: 20 ml/min.; enregistreur *Honeywell*; vitesse de déroulement du papier: 1,25 mm/min.

Pour l'obtention des chromatogrammes des figures 12 et 16: colonne d'EGA 0,325 % sur Chromosorb G 600° C a.w. 80-100 mesh, à une température initiale de 75° C et programmation de température de 2°/min.; débit d'azote: 20 ml/min.; vitesse de déroulement du papier: 1,4 mm/min.

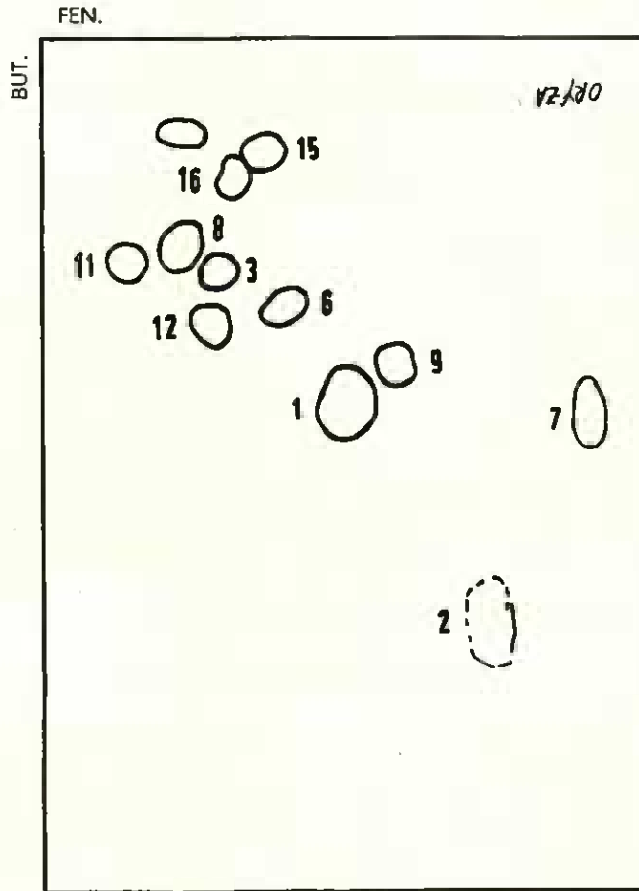


Fig. 2

Chromatogramme bidimensionnel des acides aminés  
libres d'*Oryza sativa*

- |               |                                    |
|---------------|------------------------------------|
| 1 — Alanine   | 9 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique |
| 2 — Valine    | 11 — Acide aspartique              |
| 3 — Glycine   | 12 — Acide glutamique              |
| 6 — Thréonine | 15 — Arginine                      |
| 7 — Proline   | 16 — Asparagine                    |
| 8 — Sérine    |                                    |

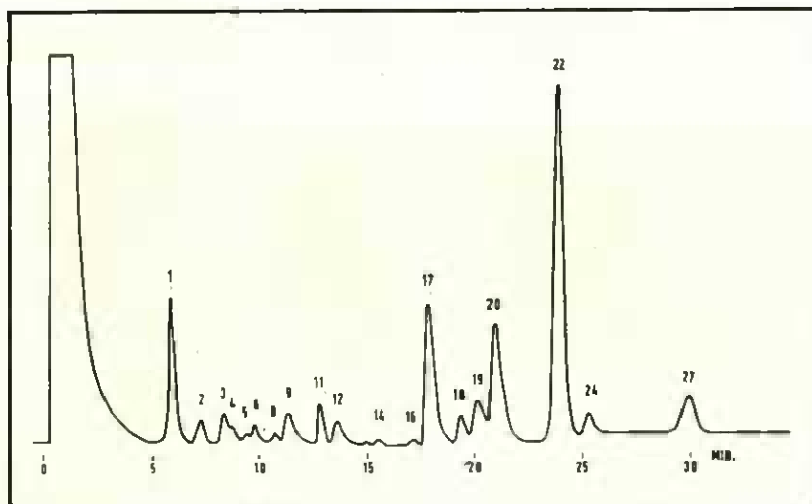


Fig. 3

Analyse par CPG des acides aminés libres d'*Oryza sativa*. Temp. in.:  
80° C; vol. inj.; 2  $\mu$ l

- |                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 — Alanine                         | 14 — Méthionine         |
| 2 — Valine                          | 16 — Phénylalanine      |
| 3 — Glycine                         | 17 — Acide aspartique   |
| 4 — Isoleucine                      | 18 — Non identifié      |
| 5 — Non identifié                   | 19 — » »                |
| 6 — Leucine                         | 20 — Acide glutamique   |
| 8 — Thréonine                       | 22 — Stéarate de butyle |
| 9 — Proline                         | 24 — Non identifié      |
| 11 — Sérine                         | 27 — » »                |
| 12 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique |                         |

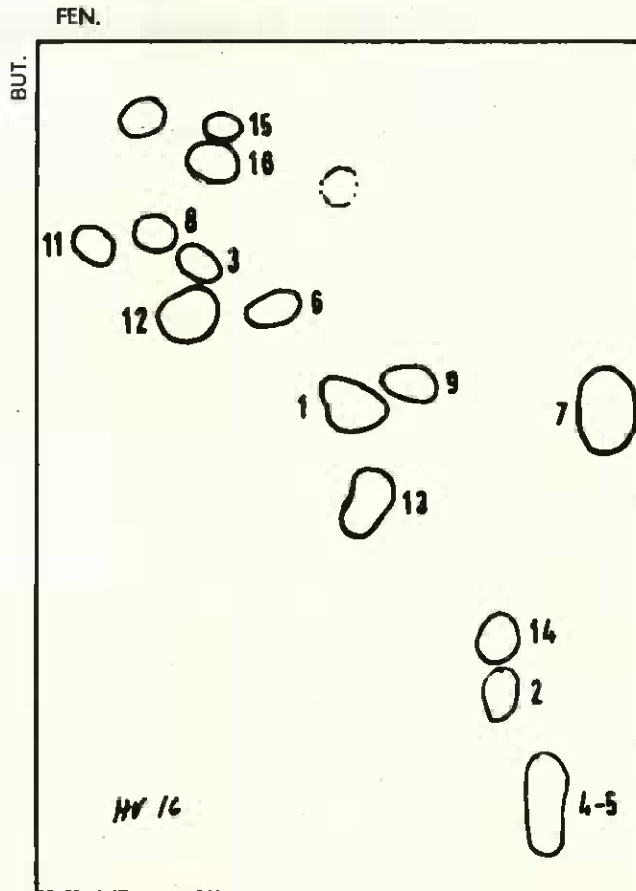


Fig. 4

*Chromatogramme bidimensionnel des acides aminés  
libres de Zea mays*

- |                           |                                    |
|---------------------------|------------------------------------|
| 1 — Alanine               | 9 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique |
| 2 — Valine                | 11 — Acide aspartique              |
| 3 — Glycine               | 12 — Acide glutamique              |
| 4-5 — Isoleucine, leucine | 13 — Tyrosine                      |
| 6 — Thréonine             | 14 — Tryptophane, méthionine       |
| 7 — Proline               | 15 — Arginine                      |
| 8 — Sérine                | 16 — Asparagine                    |

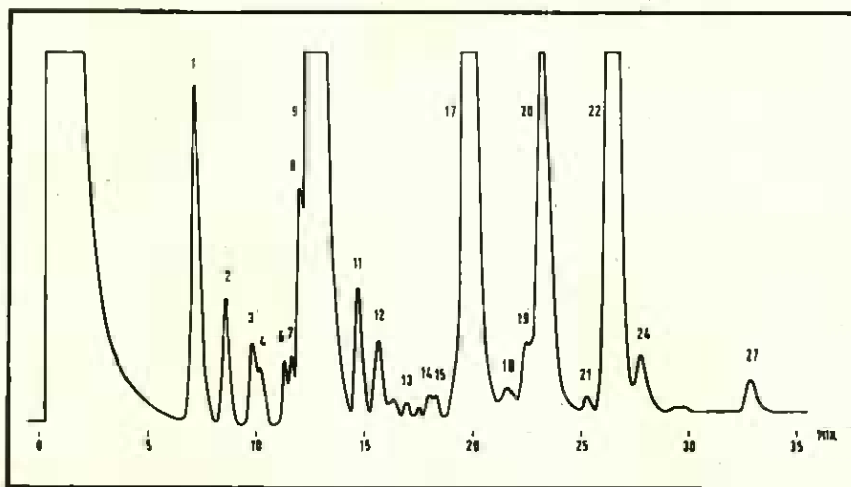


Fig. 5

Analyse par CPG des acides aminés libres de Zea mays. Temp. in.: 75° C;  
vol. inj.: 1  $\mu$ l

- |                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 — Alanine                         | 14 — Méthionine         |
| 2 — Valine                          | 15 — Hydroxyproline     |
| 3 — Glycine                         | 17 — Acide aspartique   |
| 4 — Isoleucine                      | 18 — Non identifié      |
| 6 — Leucine                         | 19 — » »                |
| 7 — Acide pipécolique               | 20 — Acide glutamique   |
| 8 — Thréonine                       | 21 — Tyrosine           |
| 9 — Proline                         | 22 — Stéarate de butyle |
| 11 — Sérine                         | 24 — Non identifié      |
| 12 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique | 27 — » »                |
| 13 — Cystéine                       |                         |

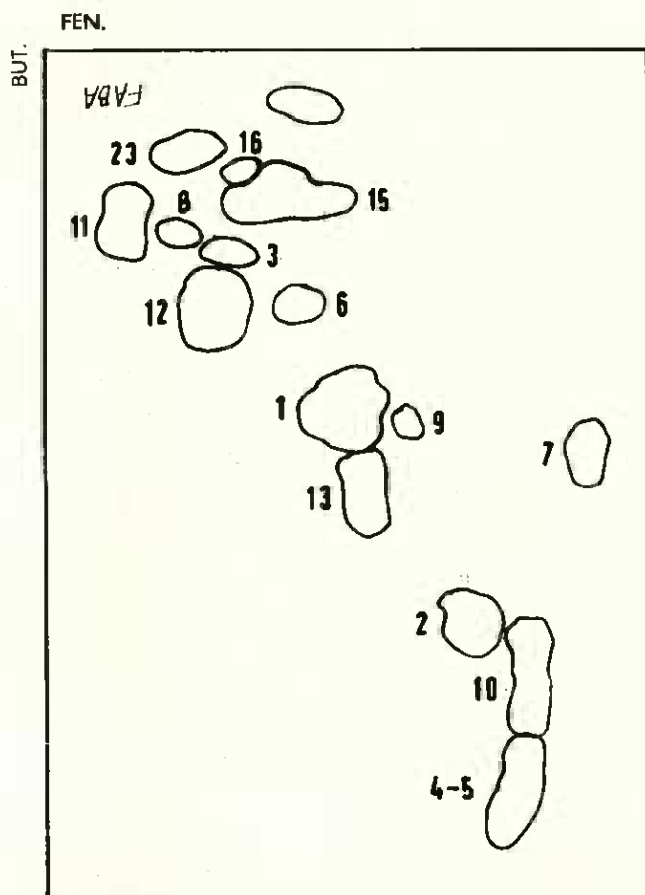


Fig. 6

*Chromatogramme bidimensionnel des acides aminés libres de Vicia faba*

- |                                    |                            |
|------------------------------------|----------------------------|
| 1 — Alanine                        | 10 — Phénylalanine         |
| 2 — Valine                         | 11 — Acide aspartique      |
| 3 — Glycine                        | 12 — Acide glutamique      |
| 4-5 — Isoleucine, leucine          | 13 — Tyrosine              |
| 6 — Thréonine                      | 15 — Arginine              |
| 7 — Proline                        | 16 — Asparagine            |
| 8 — Sérine                         | 23 — $\beta$ -cyanoalanine |
| 9 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique |                            |

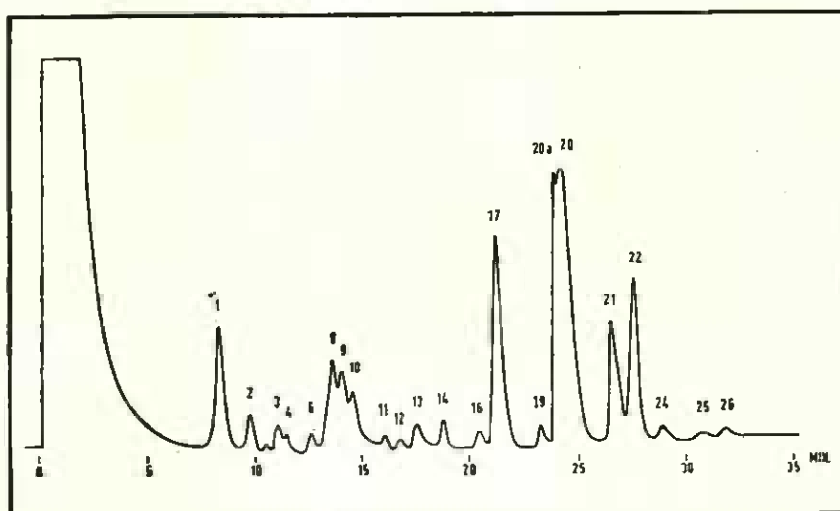


Fig. 7

Analyse par CPG des acides aminés libres de *Vicia faba*. Temp. in.: 75° C;  
vol. inj.: 1  $\mu$ l

- |                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 — Alanine                         | 14 — Méthionine         |
| 2 — Valine                          | 16 — Phénylalanine      |
| 3 — Glycine                         | 17 — Acide aspartique   |
| 4 — Isoleucine                      | 19 — Non identifié      |
| 6 — Leucine                         | 20 — Acide glutamique   |
| 8 — Thréonine                       | 20-a — Non identifié    |
| 9 — Proline                         | 21 — Tyrosine           |
| 10 — Non identifié                  | 22 — Stéarate de butyle |
| 11 — Sérine                         | 24 — Non identifié      |
| 12 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique | 25 — Lysine             |
| 13 — Cystéine                       | 26 — Tryptophane        |

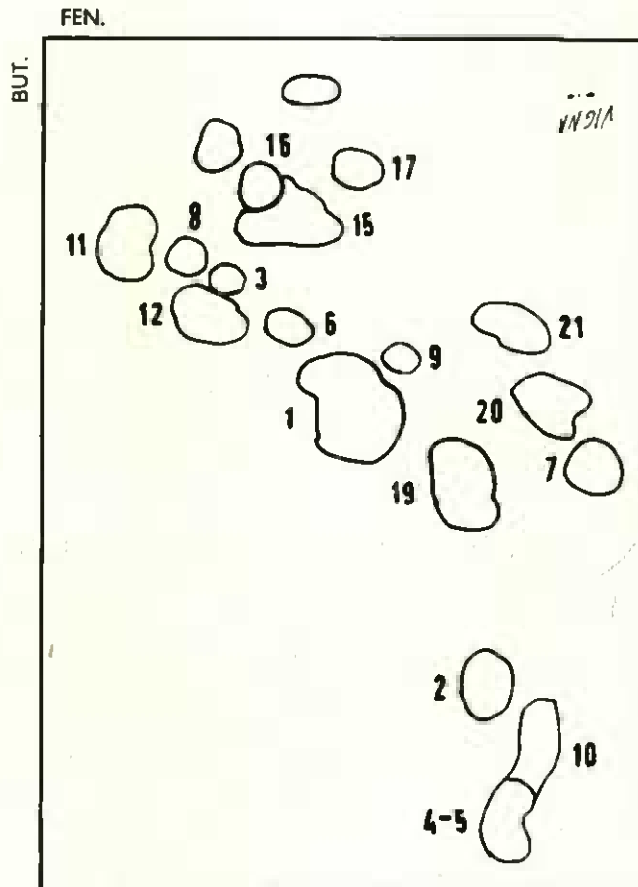


Fig. 8

*Chromatogramme bidimensionnel des acides aminés  
libres de Vigna sinensis*

- |                                    |                       |
|------------------------------------|-----------------------|
| 1 — Alanine                        | 11 — Acide aspartique |
| 2 — Valine                         | 12 — Acide glutamique |
| 3 — Glycine                        | 15 — Arginine         |
| 4-5 — Isoleucine, leucine          | 16 — Asparagine       |
| 6 — Thréonine                      | 17 — Glutamine        |
| 7 — Proline                        | 19 — S-méthylcystéine |
| 8 — Sérine                         | 20 — Non identifié    |
| 9 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique | 21 — » »              |
| 10 — Phénylalanine                 |                       |



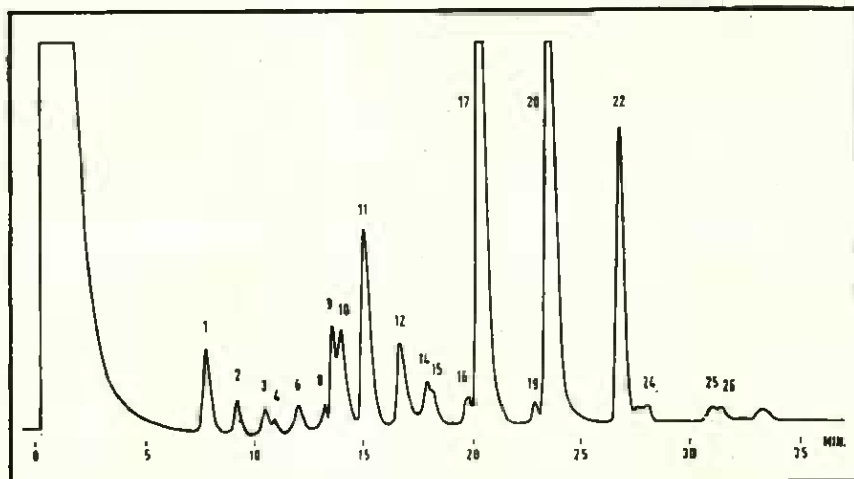


Fig. 9

Analyse par CPG des acides aminés libres de *Vigna sinensis*. Temp. in.:  
75° C; vol. inj.: 1  $\mu$ l

- |                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 — Alanine                         | 14 — Méthionine         |
| 2 — Valine                          | 15 — Hydroxyproline     |
| 3 — Glycine                         | 16 — Phénylalanine      |
| 4 — Isoleucine                      | 17 — Acide aspartique   |
| 6 — Leucine                         | 19 — Non identifié      |
| 8 — Thréonine                       | 20 — Acide glutamique   |
| 9 — Proline                         | 22 — Stéarate de butyle |
| 10 — Non identifié                  | 24 — Non identifié      |
| 11 — Sérine                         | 25 — Lysine             |
| 12 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique | 26 — Tryptophane        |

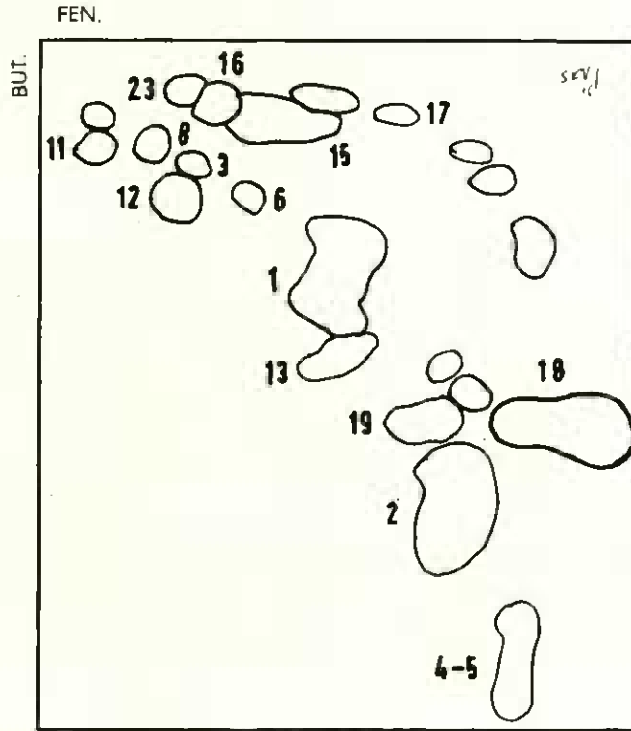


Fig. 10

*Chromatogramme bidimensionnel des acides aminés libres de Phaseolus vulgaris*

- |                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| 1 — Alanine               | 13 — Tyrosine              |
| 2 — Valine                | 15 — Arginine              |
| 3 — Glycine               | 16 — Asparagine            |
| 4-5 — Isoleucine, leucine | 17 — Glutamine             |
| 6 — Thréonine             | 18 — Acide pipécolique     |
| 8 — Sérine                | 19 — S-méthyleystéine      |
| 11 — Acide aspartique     | 23 — $\beta$ -cyanoalanine |
| 12 — Acide glutamique     |                            |

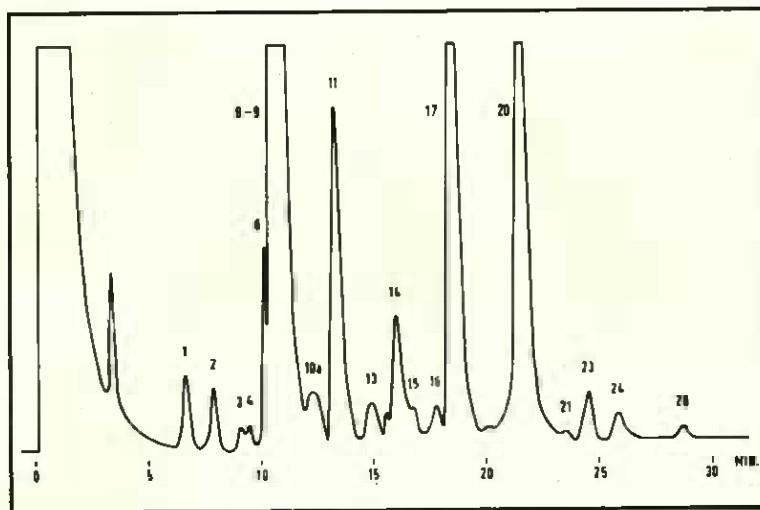


Fig. 11

Analyse par CPG sur EGSS-X — DEGS des acides aminés libres  
de Phaseolus. Temp. in.: 80° C; vol. inj.: 1  $\mu$ l

1 — Alanine  
2 — Valine  
3 — Glycine  
4 — Isoleucine  
6 — Leucine  
8 — Thréonine  
9 — Proline  
10a — Non identifié  
11 — Sérine  
13 — Cystéine

14 — Méthionine  
15 — Hydroxyproline  
16 — Phénylalanine  
17 — Acide aspartique  
20 — Acide glutamique  
21 — Tyrosine  
23 — Ornithine  
24 — Non identifié  
26 — Tryptophane

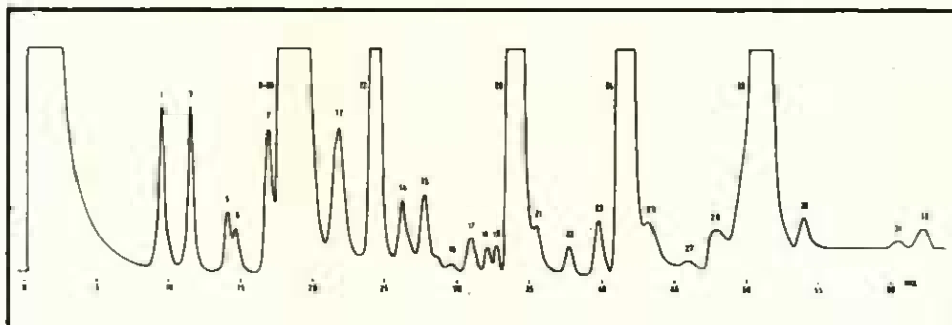


Fig. 12

Analyse par CPG sur EGA des acides aminés libres de *Phaseolus vulgaris*. Temp. in.:  
80° C; vol. inj.: 1  $\mu$ l

- |                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 — Alanine                         | 19 — Phénylalanine      |
| 3 — Vallne                          | 20 — Acide aspartique   |
| 5 — Glycine                         | 21 — Non identifié      |
| 6 — Isoleucine                      | 22 — » »                |
| 7 — Leucine                         | 23 — » »                |
| 9 — Thréonine                       | 24 — Acide glutamique   |
| 10 — Proline                        | 25 — Non identifié      |
| 12 — Sérine                         | 27 — Tyrosine           |
| 13 — S-méthylcystéine               | 28 — Non identifié      |
| 14 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique | 29 — Stéarate de butyle |
| 15 — Cystéine                       | 30 — Non identifié      |
| 16 — Hydroxyproline                 | 31 — Lysine             |
| 17 — Méthionine                     | 32 — Tryptophane        |
| 18 — Non identifié                  |                         |

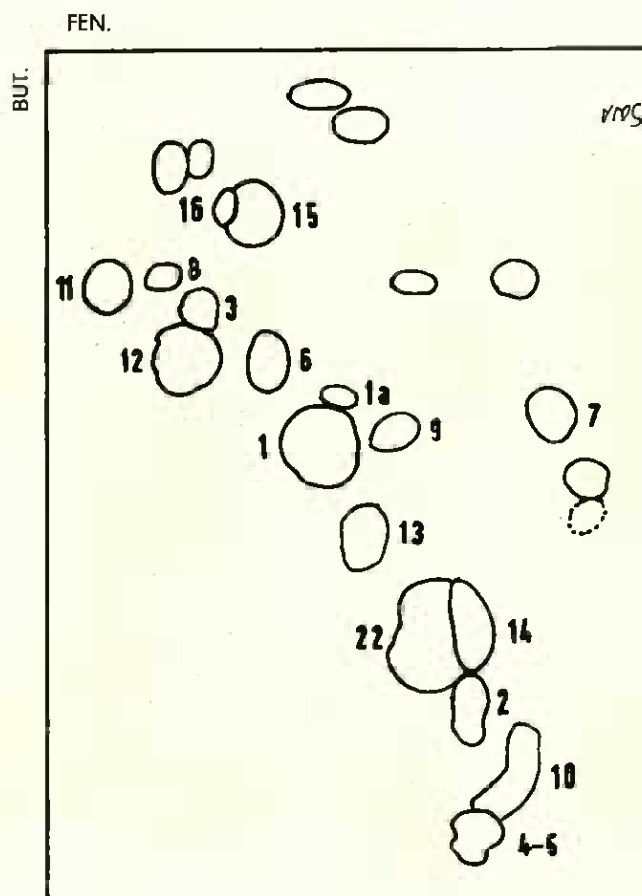


Fig. 13

*Chromatogramme bidimensionnel des acides aminés  
libres de Glycine soja*

- |                                    |                                       |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 — Alanine                        | 11 — Acide aspartique                 |
| 2 — Valine                         | 12 — Acide glutamique                 |
| 3 — Glycine                        | 13 — Tyrosine                         |
| 4-5 — Isoleucine, leucine          | 14 — Tryptophane, méthionine          |
| 6 — Thréonine                      | 15 — Arginine                         |
| 7 — Proline                        | 16 — Asparagine                       |
| 8 — Sérine                         | 22 — $\gamma$ -glutamyl-phénylalanine |
| 9 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique | 1a — $\beta$ -alanine                 |
| 10 — Phénylalanine                 |                                       |

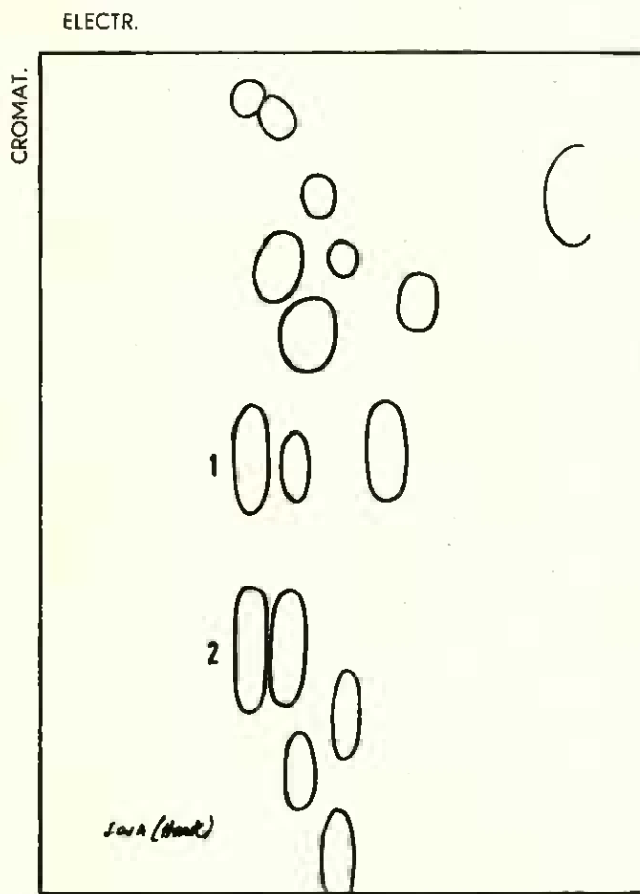


Fig. 14

*Séparation par chromatoelectrophorèse des peptides  
(1)  $\gamma$ -glutamyl-tyrosine et (2)  $\gamma$ -glutamyl-phénylalanine, dans Glycine soja*

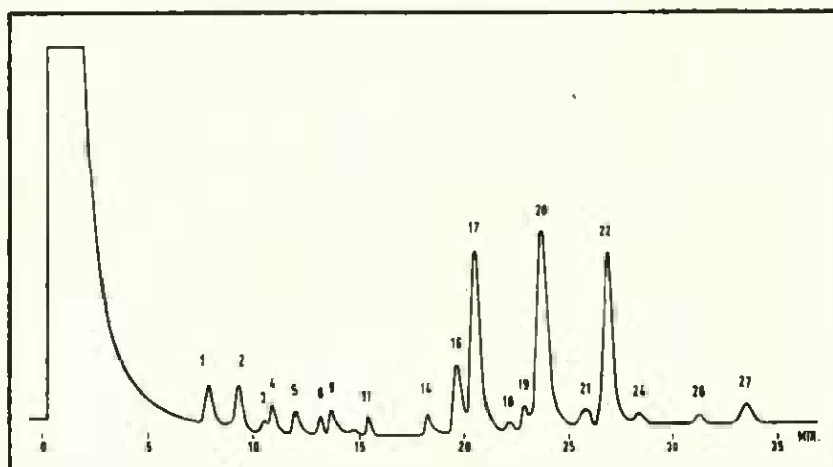


Fig. 15

Analyse sur EGSS-X — DEGS des acides aminés libres de Glycine soja.  
 Temp. in.: 78° C; vol. inj.: 1  $\mu$ l

- |                    |                         |
|--------------------|-------------------------|
| 1 — Alanine        | 17 — Acide aspartique   |
| 2 — Valine         | 18 — Non identifié      |
| 3 — Glycine        | 19 — » »                |
| 4 — Isoleucine     | 20 — Acide glutamique   |
| 5 — Non identifié  | 21 — Tyrosine           |
| 8 — Thréonine      | 22 — Stéarate de butyle |
| 9 — Proline        | 24 — Non identifié      |
| 11 — Sérine        | 26 — Tryptophane        |
| 14 — Méthionine    | 27 — Non identifié      |
| 16 — Phénylalanine |                         |

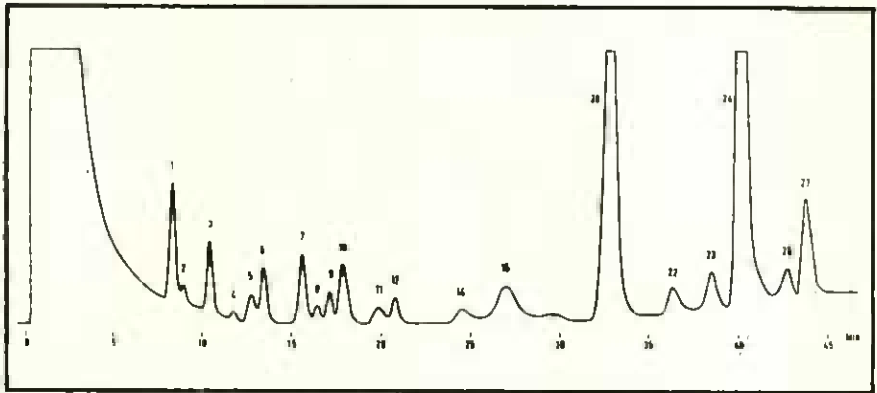


Fig. 16

*Analyse sur EGA des acides aminés libres de Glycine soja. Temp. in: 80° C;  
vol. inj.: 1 µl*

- |                       |                                     |
|-----------------------|-------------------------------------|
| 1 — Alanine           | 11 — Non identifié                  |
| 2 — (a)               | 12 — Sérine                         |
| 3 — Valine            | 14 — Acide $\gamma$ -aminobutyrique |
| 4 — Non identifié     | 15 — Cystéine                       |
| 5 — Glycine           | 20 — Acide aspartique               |
| 6 — Isoleucine        | 22 — Non identifié                  |
| 7 — Leucine           | 23 — » »                            |
| 8 — Acide pipécolique | 24 — Acide glutamique               |
| 9 — Thréonine         | 26 — Non identifié                  |
| 10 — Proline          | 27 — Tyrosine                       |

(a) C'est probablement l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique.



TABLEAU II

Résultats de l'analyse par CPG et par chromatographie sur papier

ACIDES AMINES	ORYZA		Z. MAYS		VICIA		VIGNA		PHASEOLUS		SOJA	
	CP	CPG	CP	CPG	CP	CPG	CP	CPG	CP	CPG	CP	CPG
Alanine	6	+++	5	+++	6	+++	6	+++	6(a)	++	6(a)	++
Valine	1	++	1	++	4	+++	2	++	4	++	2	++
Glycine	2	++	2	++	2	++	1	++	2	+	2	+
Isoleucine	—	++	1(b)	++	3(b)	++	1(b)	+	2(b)	+	2(b)	++
Leucine	—	++		++		++		++				
Thréonine	3	+	3	+++	2	+++	3	+	2	(c)	3	+
Proline	1	++	5	+++++	2	+++	2	+++	?	+++++	2	++
Sérine	4	++	4	++	2	+	2	++++(d)	3	++++(d)	2	++
Cystéine	(e)	o	(e)	o	(e)	++	(e)	—	(e)	+	(e)	+
Méthionine	—	o	(f)	+	—	++	—	++	—	++	(f)	++
Hydroxyproline	(g)	—	(g)	+	(g)	—	(g)	++	(g)	+	(g)	—
Phénylalanine	—	o	—	o	1	++	1	++	—	+	2	+++
Acide aspartique	4	++++(h)	5	+++++(h)	5	++++(h)	5	+++++(h)	5	+++++(h)	6	+++++(h)
Acide glutamique	4	++++(i)	6	+++++(i)	6	+++++(i)	6	+++++(i)	5	+++++(i)	6	+++++(i)
Tyrosine	—	o	2	o	1	+++	—	—	3	o	1	++
Lysine	(e)	—	(e)	—	(e)	o	(e)	o	(e)	—	(e)	—
Tryptophane	—	—	1(j)	—	—	o	—	o	—	+	3(j)	o
Arginine	4	(k)	3	(k)	6	(k)	6	(k)	6	(k)	5	(k)
Acide $\gamma$ -aminobutyrique	2	++	4	++	1	+	1	+++	—	+	2	—
$\beta$ -alanine	—	(l)	—	(l)	—	(l)	—	(l)	—	(l)	1	(l)
Asparagine	5	(h)	5	(h)	2	(h)	3	(h)	5	(h)	2	(h)
Glutamine	—	(i)	—	(i)	—	(i)	3	(i)	2	(i)	—	(i)
Acide pipécolique	—	(m)	—	(m)	—	(m)	—	(m)	6	(m)	—	(m)

+++++

quantité très importante

++++

quantité importante

+++

quantité moyenne

++

faible quantité

+

très faible quantité

o

traces

(a) En mélange avec un peptide;

(b) Non séparés sur papier avec les solvants utilisés;

(c) Masqué par une quantité importante de proline;

(d) Elué avec S-méthylcystéine;

(e) Difficile à identifier;

(f) Migre avec le tryptophane;

(g) Ne réagit pas à la ninhydrine;

(h) Acide aspartique + asparagine;

(i) Acide glutamique + glutamine;

(j) Migre avec la méthionine;

(k) N'est pas élué sur les colonnes utilisées;

(l) Elué avec la leucine;

(m) Elué avec la proline.

### III — DISCUSSION DES RESULTATS

L'étude comparée des chromatogrammes des figures 2 à 16 obtenues par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie sur papier avec les extraits des acides aminés libres des graines et leurs résultats repris dans le Tableau II montrent que:

1 — Des pics non identifiés apparaissent sur les chromatogrammes obtenus par CPG avec toutes les graines analysées. Ces pics ne correspondent à aucun des 35 acides aminés dont nous avons étudié la séparation par CPG. Dans le cas d'*Oryza sativa* les chromatogrammes sur papier ne montrent aucune tâche inconnue qui pourrait correspondre à ces pics non identifiés.

2 — Les grandeurs des pics des chromatogrammes obtenus par CPG et l'intensité de coloration des tâches des chromatogrammes sur papier présentent des divergences pour certains acides aminés de quelques graines. C'est le cas pour l'alanine dans *Phaseolus vulgaris* et *Glycine soja*, pour la valine identifiée dans *Vicia faba* et *Phaseolus vulgaris*, pour la thréonine dans *Zea mays* et dans *Vicia*, la proline dans *Phaseolus*, la sérine dans *Vigna sinensis* et *Phaseolus*, la phénylalanine identifiée dans *Glycine soja*, et la tyrosine dans *Glycine* et dans *Vicia*.

Les différences de concentration de l'alanine dans *Phaseolus* et *Glycine* doivent être attribuées à la  $\gamma$ -glutamyl-tyrosine qui migre en même temps que l'alanine sur les chromatogrammes sur papier.

La concentration apparente de valine plus importante sur les chromatogrammes sur papier de *Vicia faba* et *Phaseolus vulgaris* pourrait être due à un composé non identifié ayant le même  $R_f$  avec les solvants utilisés.

De même les quantités apparemment plus élevées de thréonine qui apparaissent sur les chromatogrammes de *Zea mays* et *Vicia* obtenus par CPG pourraient s'expliquer par l'élution d'un autre dérivé à même temps de rétention sur les colonnes utilisées.

L'importance du pic correspondant à la proline dans *Phaseolus* serait due à la théonine et à la présence d'une quantité importante d'acide pipécolique, élués en même temps.

Les chromatogrammes obtenus par CPG pour *Vigna* et *Phaseolus* montrent un pic très élevé correspondant à la sérine. Dans le cas de *Vigna* ce pic important provient du dérivé de la sérine et de la S-méthylcystéine élués en même temps tandis que pour *Phaseolus*

l'importance du pic est due à la présence de sérine, de S-méthylcystéine, et de  $\gamma$ -glutamyl-S-méthylcystéine qui s'hydrolyse. Ce fait est confirmé par le chromatogramme que nous avons obtenu sur colonne d'EGA sur laquelle le dérivé de la S-méthylcystéine a une température de rétention différente.

La valeur relativement plus importante des pics correspondant à la phénylalanine et à la tyrosine sur les chromatogrammes de *Glycine* est due à l'hydrolyse, lors de la préparation des dérivés, de la  $\gamma$ -glutamyl-phénylalanine et  $\gamma$ -glutamyl-tyrosine.

Le concentration plus élevée de tyrosine observée sur les chromatogrammes obtenus en phase gazeuse de *Vicia* pourrait également provenir de l'hydrolyse d'un peptide.

3 — Les différences apparentes de concentration observées, entre les deux méthodes, pour les acides aspartique et glutamique, proviennent de l'hydrolyse de l'asparagine et de la glutamine lors de la synthèse des dérivés utilisés pour la CPG.

#### IV — RESUME ET CONCLUSIONS

Dans ce travail nous avons étudié la préparation des esters n-butyliques N-trifluoroacétylés des acides aminés et leur séparation par chromatographie en phase gazeuse. Nous avons utilisé 35 acides aminés dont 20 acides aminés protéiques et 15 acides aminés existant à l'état libre dans les plantes. Nous avons ensuite appliqué cette méthode à l'analyse des acides aminés libres de quelques graines et comparé les résultats avec ceux de la chromatographie sur papier. L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes:

1 — En général, les dérivés des acides aminés sont synthétisés avec une reproductibilité convenable.

2 — Tous les esters butyliques préparés subissent une dégradation dans le temps, variable d'un acide aminé à l'autre. Ainsi est il indispensable d'effectuer l'analyse chromatographique immédiatement après la synthèse.

3 — Etant donné le grand nombre d'acides aminés libres qui peuvent exister dans les milieux biologiques, leur identification basée uniquement sur la CPG n'est pas toujours possible.

D'autre part, en raison de l'hydrolyse que subissent au cours de

la synthèse l'arginine, la glutamine et les peptides présents dans les extraits, leur analyse qualitative n'est pas possible et l'analyse quantitative des acides aminés libres correspondant aux acides aminés libérés au cours de cette hydrolyse conduit à des résultats érronés.

Dans la plupart des cas nous avons observé une bonne concordance entre les résultats des analyses par chromatographie sur papier et les résultats des analyses par CPG. Nous avons pu justifier la plupart des divergeances apparentes observées.

L'étude comparative a mis en évidence l'existence d'acides aminés spéciaux révélés par CPG dont quelques-uns peuvent correspondre à des tâches non identifiées sur papier.

Malgré les restrictions signalées, nous estimons que dans l'analyse des acides aminés libres des plantes, la CPG peut rendre des services très appréciables, particulièrement si les résultats qu'elle permet sont comparés avec ceux donnés par la chromatographie sur papier.

## BIBLIOGRAPHIE

BAYER, E.

- 1958 Separation of derivatives of amino acids using gas-liquid chromatography. *Gas Chromatography*. Butterworths, London, 333-342.

BAYER, E., REUTHER, K. H., BORN, F.

- 1957 Analyse von Aminosäure Gemischen mittels Gasverteilungschromatographie. *Angew. Chem.*, **69**, 640.

BELL, E. A.

- 1962 Associations of ninhydrin-reacting compounds in the seeds of 49 species of *Lathyrus*. *Biochem. J.*, **88**, 225-229.  
1963 Certain non-proteic amino-acids of plants and their effects on animals. *Biochem. J.*, **88**, 58P-59P.

BELL, E. A., TIRIMANA, A. S.

- 1965 Associations of amino acids and related compounds in the seeds of 47 species of *Vicia*. Their taxonomic and nutritional significance. *Biochem. J.*, **97**, 104-111.

BLAU, K.

- 1968 Analysis of amino acids by gas-chromatography, *Biomedical Applications of Gas Chromatography*, Vol. 2. Plenum Press, London.

BLAU, K., DARBRE, A.

- 1963 Preparation of volatile derivatives of amino acids for gas-chromatography. *Biochem. J.*, **88**, 8P-9P.  
1965 Analyse quantitative des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse. *Chim. Anal.*, **47**, 631-633.  
1965b Gas chromatography of volatile amino acid derivatives (II). *J. Chromatog.*, **17**, 445-449.  
1967 Gas chromatography of volatile amino acid derivatives (III). *J. Chromatog.*, **26**, 35-40.

CASIMIR, J., LEMARCHAND, G.

- 1966 Répartition et importance systématique des acides aminés et des peptides libres des *Phaseolinae*. *Bull. Jard. Bot.*, **36**, 53.

DARBRE, A., BLAU, K.

- 1965a Gas chromatography of volatile amino acids derivatives (I). *J. Chromatog.*, **17**, 31-49.  
1965b Trifluoroacetylated amino acid esters: the stability of the derivatives of cysteine, hydroxyproline, serine, threonine, and tyrosine. *Bioch. Biophys. Acta*, **100**, 298-300.  
1967 Gas chromatography of volatile amino acid derivatives (IV). *J. Chromatog.*, **29**, 49-57.

DARBRE, A., ISLAM, A.

- 1968 Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl esters. *Biochem. J.*, **106**, 923-925.

DARDENNE, G., CASIMIR, J.

- 1968 Séparation et caractérisation du L(-) 5-méthyl 2-amino 4-hexénoïque à partir de *Leococortinarius Bulbiger*. *Phytochemistry*, **7**, 1401-1406.

DARDENNE, G., SEVERIN, M., MARLIER, M.

- 1969 Chromatographie en phase gazeuse de nitriles. II — Application à l'identification d'acides aminés isomères. *J. Chromatog.*, **47**, 182-185.

DEL FAVERO, A., DARBRE, A., WATERFIELD, M.

- 1969 Gas-liquid chromatography of radioactive amino acids as their trifluoroacetyl ester derivatives. *J. Chromatog.*, **40**, 213-218.

DENT, L. E., STEPKA, W., STEWARD, F. C.

- 1947 Detection of the free amino acids of plant cells by partition chromatography. *Nature*, **160**, 682.

ETTRE, L. S.

- 1962 13th Annual Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Pittsburgh.

FOWDEN, L.

- 1958 New amino acids of plants. *Biol. Rev.*, **33**, 393-441.  
1962a The non-proteic amino acids of plants. *Endeavour*, **21**, 35-42.  
1962b *Amino Acid Pools*. Elsevier, Amsterdam.  
1964 The chemistry and metabolism of recently isolated amino acids. *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 173-204.

FOWDEN, L., WEBB, J. A.

- 1955 Evidence of the occurrence of  $\gamma$ -methylene- $\alpha$ -oxoglutaric acid in groundnut plants. *Biochem. J.*, **59**, 228-234.

- GEETS, O.  
1969 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides aminés n-butyl N-trifluoroacétylés. *Trav. f. études. Fac. Sc. Agro. de l'Etat, Gembloux.*
- GEHRKE, C. W., LAMKIN, W. M., STALLING, D. L., SHAHROKHI, F.  
1965 Quantitative gas chromatography of amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **10**, 328-334.
- GEHRKE, C. W., SHAHROKHI, F.  
1966 Chromatographic separation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters of amino acids. *Anal. Biochem.*, **15**, 97-108.
- GEHRKE, C. W., NAKAMOTO, H., ZUMWALT, K.  
1969 Gas-liquid chromatography of protein amino acids trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatog.*, **45**, 24-51.
- GEHRKE, C. W., STALLING, D. L.  
1966 Quantitative analysis of the twenty natural protein amino acids by gas-liquid chromatography. *19th Ann. Summer Symp., Univ. of Alberta, Canada.*
- GEHRKE, C. W., ZUMWALT, B., WALL, L.  
1968 Gas-liquid chromatography of protein amino acids. Separation factors. *J. Chromatog.*, **37**, 398-413.
- GEIRLAXHE, S., RENARD, M.  
1954 La chromatographie électrophorèse des acides aminés. *C. R. du XXVII Congrès Intern. de Chimie Industr.*, **3**, 509.
- GEIRLAXHE, S., CASIMIR, J., RENARD, M.  
1957 La séparation des acides aminés basiques par chromatographie électrophorèse sur papier. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **66**, 251.
- GMELIN, R.  
1959 Die freien Aminosäuren der Samen von *Acacia Willardiana*. *Z. Physiol. Chem.*, **316**, 164-169.
- HALPERN, B., CLOSE, V., WEGMANN, A., WESTLEY, J. W.  
1968 Gas chromatography of amino acids as N-thiocarbonyl ester derivatives. *Tetrahedron Letters*, **27**, 3119-3122.
- HERB, S. F.  
1968 Gas-liquid chromatography of lipids, carbohydrates and amino acids. *Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 784-788.
- HUNTER, I. R., DIMICK, K. P., CORSE, J. W.  
1966 Determination of amino acids by ninhydrin oxidation and gas chromatography. *Chemistry Ind., London.*

- KLEBE, J. F., FINKBEINER, H., WHITE, D. M.  
1966 Silylations with bis (trimethylsilyl) acetamide. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3390-3395.
- LAMKIN, W. M., GEHRKE, C. W.  
1965 Quantitative gas chromatography of amino acids. Preparation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters. *Anal. Chem.*, **37**, 383-398.
- LEDERER, E.  
1955 *Paper Electrophoresis*. Elsevier, Amsterdam.
- MAKISUMI, J., NICHOLLS, C. H., SAROFF, H. A.  
1963 The influence of esterifying and acetylating groups on the retention times of amino acid derivatives in gas chromatography. *J. Chromatog.*, **12**, 106-108.
- MARCUCCI, F., MUSSINI, E., POY, F., GAGLIARDI, P.  
1965 Separation of amino acids as their N-trifluoroacetyl-n-butyl esters by gas chromatography. *J. Chrom.*, **18**, 487-491.
- PFEIFFER, S., ZENON L., BOCHE, C., LEONIS, J.  
1967 Séparation des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse. *Soc. Belge Bioch., Réunion de Gif. s/Yvette et Paris*, 12-13.
- ROACH, D., GEHRKE, C. W.  
1969a The gas-liquid chromatography of amino acids. *J. Chromatog.*, **43**, 303-310.  
1969b Direct esterification of the protein amino acids. *J. Chromatog.*, **44**, 269-278.
- ROACH, D., GEHRKE, C., ZUMWALT, R. W.  
1969 Quantitative gas-liquid chromatography of histidine. *J. Chromatog.*, **43**, 311-321.
- RODA, G., ZAMORANI, A.  
1970 Gas chromatographic analysis of amino acids as trifluoroacetylated phenylthiohydantoins. *J. Chromat.* **46**, 315-316.
- RÜHLMANN, K., GIEZECKE, W.  
1961 Gaschromatographie Silylester der Aminosäuren. *Angew. Chem.*, **73**, 113.
- RÜHLMANN, K., MICHAEL, G.  
1963 Zur Gas-Chromatographie der N-Trimethylsilylaminosäure-Trimethylsilylester. *Ed. Gas Chromatographie, 1963. Akad. Verlag, Berlin*, 150-157.  
1965 Neue Versuche zur Gas-Chromatographie der Aminosäuresilylderivate. *Ed. Gas Chromatographie, 1965. Akad. Verlag, Berlin*.



SEVERIN, M., RENARD, M.

- 1963 Etude par chromatographie gazeuse de l'action de l'hypochlorite de soude sur les acides aminés. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **12**, 649-652.

SHILLING, E. D., STONG, F. M.

- 1954 Isolation, structure and synthesis of a *Lathyrus* factor from *L. Odoratus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2848.

STALLING, D. L., GEHRKE, C.

- 1966 Quantitative analysis of amino acids by gas chromatography: acylation of arginine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **22**, 329-335.

STEFANOVIC, M., WALKER, B. L.

- 1967 Effect of stationary phase-support ratio on the gas chromatographic separation of trifluoroacetyl amino acid butyl esters. *Anal. Chem.*, **39**, 710-713.

STEIN, W. H., MOORE, S.

- 1948 Chromatography of amino acids on strach columns. *J. Biol. Chem.*, **176**, 337-338.

THOMPSON, J. F., MORRIS, G.J., GERING, R. K.

- 1959 Purification of plant amino acids for paper chromatography. *Anal. Chem.*, **31**, 1028-1031.

VOGEL, A. I.

- 1962 *Practical Organic Chemistry*, 3. ed. *Longmans*, London.

YOUNGS, C. G.

- 1959 Analysis of mixtures of amino acids by gas phase chromatography. *Anal. Chem.*, **31**, 1019-1021.

ZOMZELY, C., MARCO, G., EMERY, E.

- 1962 Gas chromatography of the n-butyl N-trifluoroacetyl derivatives of amino acids. *Anal. Chem.*, **34**, 1414-1417.