

UNIVERSITE DE LIEGE
INSTITUT DE BIOLOGIE GÉNÉRALE

SUR
L'ADSORPTION D'ACIDES AMINÉS
PAR LE SULFATE DE BARYUM

PAR
P. TARTE

Extrait du *Bulletin de la Société royale des Sciences de Liège*
(Séance du 19 avril 1945. — N° 4.)

BRUXELLES
M. HAYEZ, IMPRIMEUR DE L'ACADÉMIE ROYALE DE BELGIQUE
Rue de Louvain, 112
(Domicile légal: rue de la Chancellerie, 4)

1945



Sur l'adsorption d'acides aminés par le sulfate de baryum,

par P. TARTE (*).

INTRODUCTION.

Dans un travail sur la chromatographie en solution aqueuse, HAMOIR (1) a montré que les propriétés adsorbantes des précipités minéraux permettent de réaliser des séparations quantitatives d'acides aminés. On active le précipité par un sel soluble du même métal (exemple : Ag_2S par AgNO_3), et le précipité ainsi activé est susceptible de fixer les anions, formant avec Ag un sel peu soluble ou insoluble.

(*) Présenté par M. Dubuisson.

Le schéma de la réaction est simple (1). Le précipité de Ag_2S , traité par une solution de AgNO_3 , adsorbe fortement des ions Ag^+ (ion commun avec celui du réseau), lesquels retiennent électrostatiquement des ions NO_3^- . Ces derniers peuvent donner lieu à des réactions d'échange : ils seront déplacés par des ions négatifs formant avec Ag des sels peu solubles. Si HR est un acide dont le sel d'argent est peu soluble, on aura :



De tels précipités présentent sur les adsorbants généralement utilisés en chromatographie (alumine, silicates, charbon actif) des avantages importants : les résultats sont facilement reproductibles et, surtout, il est possible de prévoir le comportement d'une substance (acide aminé par exemple) vis-à-vis d'un adsorbant donné. Il existe toutefois un inconvénient : les quantités adsorbées sont très petites, de l'ordre de 1 mgr pour 10 grs d'adsorbant.

Nous nous sommes proposé d'appliquer cette méthode à la séparation quantitative des acides aminés dicarboxyliques. Deux méthodes sont actuellement utilisées dans ce but, mais aucune ne donne des résultats pleinement satisfaisants.

1. Méthode gravimétrique.

On précipite les acides dicarboxyliques à l'état de sels de baryum par la baryte en présence d'alcool (3) (4). On chasse le baryum du précipité par l'acide sulfurique, on filtre, on concentre et on sature la solution de HCl , puis on abandonne à la glacière : l'acide glutamique précipite à l'état de chlorhydrate ; dans le filtrat, débarrassé d'ions Cl^- et SO_4^{2-} , on précipite l'acide aspartique à l'état de sel d'argent et on le pèse sous forme de sel de cuivre.

Cette méthode doit donner des résultats trop faibles, car :

- a) la solubilité des composés précipités (chlorhydrate de l'acide glutamique, aspartate de cuivre) n'est pas négligeable ;
- b) l'élimination du baryum à l'état de sulfate doit provoquer des pertes par entraînement et adsorption, car divers auteurs (5) (6) (7) ont observé (et nos expériences l'ont montré) que le sulfate de baryum adsorbe les acides aminés dicarboxyliques.

(1) Pour les différents types d'adsorption, voir KOLTHOFF (2).

2. Méthode chromatographique.

L'alumine activée par une solution-tampon acide acétique-acétate de pH 3.3 adsorbe seulement les acides glutamique et aspartique (8); comme, d'autre part, l'acide glutamique est éliminé de la colonne dans des conditions où l'acide aspartique y reste fixé, cette méthode permet donc de séparer les acides dicarboxyliques des autres acides aminés et de séparer les acides dicarboxyliques entre eux. Ici, les résultats sont quantitatifs; mais la reproductibilité n'est pas très bonne par suite de différences dans les propriétés adsorbantes des divers échantillons d'alumine (9).

Or, les acides aminés dicarboxyliques possèdent en commun une propriété intéressante : leur sel de baryum est moins soluble dans l'eau que celui des autres acides aminés. Ceci permet de prévoir qu'ils seront adsorbés par un sel de baryum insoluble. Nous avons donc étudié le comportement des acides aminés vis-à-vis du sulfate de baryum. Voici les résultats de nos expériences.

TECHNIQUE.

Le sulfate de baryum a été préparé par la méthode de ANDREASEN (10), qui donne des résultats facilement reproductibles. Le mode opératoire choisi est le suivant :

On prépare deux solutions, I et II, dont voici la composition :

Solution I	BaCl ₂	1/6 molaire	500 cc
	HCl	10 N	250 cc
	H ₂ O		100 cc
Solution II	H ₂ SO ₄	1/6 molaire	500 cc
	HCl	10 N	250 cc
	H ₂ O		100 cc

On laisse revenir ces solutions à la température du laboratoire (en les abandonnant du jour au lendemain), puis on les verse simultanément dans un troisième récipient, on agite et on laisse le sulfate se déposer. Le précipité pèse 18.5 gr et est formé de sphérolithes de 15 μ . Il est lavé par décantation, puis abandonné 15 jours dans l'eau distillée (vieillessement). Le sulfate est traité pendant quelques heures par 100 cc d'une solution à 1 % de BaCl₂ (activation); on le lave ensuite par décantation jusqu'à disparition des ions Ba⁺⁺ dans le filtrat.

On utilise comme support de l'adsorbant des creusets-filtres en verre d'Iéna. On met le sulfate en suspension dans l'eau, on verse le tout en une fois dans le creuset, on laisse le sulfate se déposer puis on provoque, à la trompe, une légère aspiration

qui amène le tassement définitif du précipité. La colonne d'adsorption est prête.

La technique des filtrations est très simple. On verse doucement dans la colonne un volume exactement mesuré de la solution d'acide aminé⁽²⁾ : le lavage et l'élution se font par portions de 100 cc qu'on recueille dans des ballons à distiller de 250 cc. La vitesse de filtration est réglée à 20 gouttes par minute, soit 100 cc en 45 minutes. On concentre chaque portion sous vide et on transvase quantitativement dans un ballon jaugé de 25 cc. On prélève alors des parties aliquotes de 5 cc qu'on soumet à un dosage d'azote par la microméthode de Van Slyke (réaction avec HNO_2 et mesure manométrique de l'azote dégagé). En général, chaque solution est soumise à trois dosages; il est rare que l'on n'obtienne pas au moins deux valeurs concordantes (différences de $\frac{1}{2}$ mm de Hg ou moins; l'erreur relative est de quelques %). Il arrive parfois que l'un des dosages fournisse une valeur assez différente (écart de plus de 1 mm); cette dernière valeur est alors écartée du calcul de la moyenne.

Il convient d'ailleurs de noter ici un phénomène inexpliqué, qui a été également observé par HAMOIR (1), quoique sur une échelle moindre : si on filtre sur la colonne de l'eau bidistillée, le dosage du filtrat fournit un blanc *supérieur* à un blanc normal; la différence est de 1 mm environ; la filtration d'acide acétique N/1000 ou N/100 donne des chiffres plus forts encore (2-3 mm).

Il est donc nécessaire d'affecter les résultats d'une correction qu'il est d'ailleurs facile de déterminer, car elle reste constante au cours de la filtration. Il suffit de filtrer après l'élution 100 cc du liquide d'élution, dont le dosage fournira la correction cherchée.

EXEMPLE. — On filtre 1 mgr d'acide glutamique sur 18.5 gr de sulfate et lave avec 4 fois 100 cc d'acide acétique N/1000. Cette quantité d'acide glutamique donne au Van Slyke 12.5 mm d'azote. On obtient les résultats suivants :

Solution I	14.1 mm
Solution II	1.9 mm
Solution III	1.6 mm
Solution IV	1.7 mm

(2) Dans les cas des acides diaminés ou des acides dicarboxyliques, on ajuste la solution au pH 6 par addition d'une quantité convenable d'acide acétique ou de soude N/10. Les pH sont mesurés à l'électrode de verre.

Cette expérience montre que la correction est pratiquement constante (1.9, 1.6, 1.7), aux erreurs de dosage près. Il suffit donc de soustraire cette valeur du chiffre obtenu pour le premier dosage pour obtenir le résultat correct : 12.4 mm.

Remarquons enfin, pour terminer, qu'entre les diverses opérations il est nécessaire de conserver les solutions en glacière; à la température ordinaire, la teneur en azote aminé diminue d'une façon sensible au cours du temps (à la suite du développement de moisissures).

RÉSULTATS.

1. Le comportement des acides aminés vis-à-vis du sulfate de baryum.

L'étude systématique du comportement des acides aminés vis-à-vis du sulfate de baryum vieilli et activé par BaCl₂ donne les résultats suivants :

a) ACIDES AMINÉS MONOCARBOXYLIQUES. — Conditions expérimentales : quantité d'acide filtré : 2.5 mgr (sauf pour la cystine); quantité d'adsorbant : 37 gr; vitesse de filtration : 100 cc en 45 minutes. Le lavage est effectué par portions de 100 cc d'eau bidistillée. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

b) ACIDES AMINÉS DICARBOXYLIQUES. — Conditions expérimentales : quantité d'acide filtré : 1 mgr ou 2.5 mgr; quantité d'adsorbant : 18.5 gr; vitesse de filtration : 100 cc en 45 minutes.

Acide glutamique. — On filtre 1 mgr d'acide, puis 5 fois 100 cc d'eau bidistillée. Les dosages donnent les résultats suivants :

Solution	mm d'azote
I	2.7
II	2.0
III	2.2
IV	2.1
V	1.8
Total... ..	10.8

dont il faut encore retrancher la correction, impossible à déterminer ici.

Théorie : 12.5 mm.

Après lavage avec 500 cc d'eau bidistillée, on ne retrouve donc qu'une petite partie de l'acide filtré.

Si l'on opère avec une quantité plus grande d'acide glutamique (2.5 mgr au lieu de 1 mgr), et qu'on lave avec 100 cc

TABLEAU I.

Acide aminé	mm d'azote trouvés dans les 100 premiers cc	mm d'azote calculés	Retrouvé dans les 100 premiers cc %
Glycocolle . . .	60,4	60,6	99,6
Alanine	51,3	51,0	100,6
Leucine	35,1	34,7	101,-
Valine	38,6	38,7	99,7
Sérine	44,2	43,3	102,-
Méthionine . . .	30,9	30,4	101,3
Cystine	32,8	33,0	99,4
Phénylalanine	27,7	27,4	101,-
Tyrosine	24,6	25,1	98,-
Tryptophane . .	28,2	28,2	100,-
Histidine	29,2	29,1	100,5
Lysine	44,1	44,4	99,3
Arginine	31,1	31,4	99,-

d'eau bidistillée, le filtrat fournit au dosage une quantité d'azote (14.8 mm) correspondant à 1.2 mgr d'acide glutamique. Si l'on continue à laver à l'eau bidistillée, la vitesse d'élution tombe fortement et atteint rapidement les valeurs données par l'expérience précédente. L'acide glutamique est donc adsorbé (environ 1.3 mgr pour 20 gr de sulfate), mais la fixation n'est pas définitive : l'eau provoque une élution lente. L'élution est beaucoup plus rapide avec l'acide acétique N/1000 : on retrouve tout l'acide glutamique filtré dans les 100 premiers cc d'acide acétique N/1000. Il est à noter que ce moyen d'élution n'est nullement empirique : il se base sur le fait que le sel de baryum des acides dicarboxyliques est soluble en milieu acide.

Acide aspartique. — On filtre 1 mgr d'acide et on lave par 3 fois 100 cc d'eau bidistillée (solutions I, II, III), 3 fois 100 cc de HAc N/1000 (solutions IV, V, VI), 3 fois 100 cc de HAc N/100 (solutions VII, VIII, IX).

On obtient les résultats suivants :

Solution	mm d'azote	
	non corrigé	corrigé
I	1.0	0
II	0.7	0
III	0.9	0
IV	1.7	0
V	1.7	0
VI	1.9	0
VII	16.5	14.0
VIII	2.3	0
IX	2.6	0

L'éluion est nulle par l'eau et l'acide acétique N/1000, car on retrouve tout l'acide aminé (14 mm; théorie : 13,8 mm) avec l'acide acétique N/100.

Si l'on filtre 2.5 mgr d'acide aspartique, puis 100 cc d'eau, le filtrat donne 5.1 mm d'azote; il contient donc 0.37 mgr d'acide. 18 gr de BaSO₄ fixent donc une quantité d'acide aspartique de l'ordre de 2 mgr.

Ces expériences montrent que, des acides glutamique et aspartique, c'est l'acide aspartique qui est le plus fortement fixé. *Ceci est en parfait accord avec l'insolubilité plus grande de son sel de baryum.*

Remarquons que les vitesses d'éluion dépendent de la vitesse de filtration : les résultats donnés ici sont valables pour une vitesse de filtration de l'ordre de 100 cc en 45 minutes. Voici les résultats d'une expérience relative à ce sujet :

On filtre 1 mgr d'acide glutamique sur 18.5 gr de sulfate et on lave avec 3 fois 100 cc d'eau bidistillée. Les deux premières portions sont filtrées à la vitesse ordinaire (100 cc en 45 minutes); la troisième est filtrée beaucoup plus lentement (100 cc en 2 h. ½ environ). Les dosages donnent les valeurs suivantes :

Solution	mm d'azote
I	2.5
II	2.3
III	9.3

En résumé, ne sont pas adsorbés par le BaSO₄ : glycocolle, alanine, leucine, valine, sérine, méthionine, cystine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine, lysine, arginine.

Sont adsorbés par le BaSO₄ :

l'acide glutamique; la fixation n'est pas définitive : il se pro-

duit une élution lente par l'eau, rapide par l'acide acétique N/1000;

l'acide aspartique; la fixation est beaucoup plus forte : l'élution est nulle par l'eau et l'acide acétique N/1000, totale par l'acide acétique N/100.

2. Influence de divers facteurs sur les propriétés adsorbantes du BaSO₄.

a) LE VIEILLISSEMENT DU PRÉCIPITÉ. — Nous avons constaté, au cours de ces expériences, un vieillissement très net du précipité. Les acides glutamique et aspartique sont fixés fortement par un précipité fraîchement préparé. Voici les expériences relatives à ce sujet :

On filtre 1 mgr d'acide glutamique sur 18.5 gr de BaSO₄ et on lave avec deux fois 100 cc HAcN/1000.

Solution	mm d'azote	
	Précipité jeune	Précipité vieux
I	1.8	13.8
II	2.2	2.1

Entre les deux filtrations, le précipité est conservé deux semaines dans l'eau.

L'élution est presque nulle par l'acide acétique N/1000, si le précipité est jeune; totale avec 100 cc du même acide, si le précipité est vieux.

Les phénomènes présentent la même allure avec l'acide aspartique. On filtre 1 mgr d'acide aspartique sur 18.5 gr de sulfate et on lave avec 2 fois 100 cc d'acide acétique N/100.

Solution	mm d'azote	
	Précipité jeune	Précipité vieux
I	2.5	16.1
II	2.9	2.1

Nous avons alors tenté une séparation acide glutamique-acide aspartique en utilisant toujours le même précipité et en suivant l'allure des phénomènes au cours du temps. Voici les conditions de cette expérience : poids de BaSO₄ : 37 gr; poids d'acides aminés : 2.5 mgr d'acide glutamique + 2.5 mgr d'acide aspartique; élution : 4 fois 100 cc HAcN/1000 (solutions I à IV)

et 3 fois 100 cc HACN/50 (solutions V à VII); vitesse de filtration : 18 gouttes par minute (100 cc en 50 minutes).

Solution	mm d'azote pour un précipité âgé de :			
	1 jour	4 jours	9 jours	14 jours
I	2.3	5.2	10.7	15.1
II	0.3	6.4	16.0	16.9
III	4.2	11.0	9.3	5.1
IV	5.0	7.9	2.7	1.7
V	6.0	3.7	21.6	23.0
VI	3.1	9.8	9.9	16.5
VII	4.0	9.4	5.1	2.2

Entre les expériences, le précipité était abandonné dans l'eau. La dernière filtration réalise une séparation quantitative des acides glutamique et aspartique : on retrouve 102 % du premier et 101 % du second (les erreurs sont de l'ordre de grandeur des erreurs commises dans les dosages).

Après cette période de deux semaines environ, l'évolution des propriétés du précipité est plus lente : un précipité (18.5 gr) ayant séjourné deux semaines environ dans l'eau adsorbe une quantité d'acide glutamique de l'ordre de 1.3 mgr; le même précipité vieux de deux mois adsorbe encore 0.8 mgr d'acide glutamique. Nous avons utilisé dans nos expériences des précipités dont l'âge était compris entre deux semaines et un mois.

b) LE MODE D'ACTIVATION. — En utilisant du nitrate de baryum au lieu de chlorure, on observe des différences dans le pouvoir adsorbant du précipité, ce qui est d'ailleurs normal, car la solubilité du nitrate barytique est 4 fois plus petite que celle du chlorure (solubilité de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$: 36 gr dans 100 cc à 20°; solubilité du nitrate : 8.7 gr dans 100 cc à 20°).

Ces différences portent seulement sur le comportement de l'acide glutamique : il n'est pas adsorbé par une colonne activée par du nitrate :

On filtre 1 mgr d'acide glutamique sur 18.5 gr de $BaSO_4$ activé par $Ba(NO_3)_2$ et on lave avec 3 fois 100 cc d'eau bidistillée.

Solution	mm d'azote	
	non corrigé	corrigé
I	7.6	6.5
II	6.9	5.8
III	1.1	0

Théorie : 12.5 mm.

Retrouvé : 12.3 mm.

L'éluion est donc totale par 200 cc d'eau bidistillée (rappe-
lons que, dans les mêmes conditions, mais sur une colonne
activée par BaCl₂, l'éluion est beaucoup plus lente).

Le comportement de l'acide aspartique ne change pas. L'élu-
ion est nulle par l'eau bidistillée et l'acide acétique N/1000,
totale par l'acide acétique N/100.

De ceci, il ressort que l'insolubilité du glutamate de baryum
n'est pas suffisante pour que l'ion de l'acide glutamique soit
capable de déplacer l'ion NO₃. Ce n'est pas le cas de l'acide
aspartique, ce qui est conforme à l'insolubilité plus forte de
son sel de baryum.

3. Application : Séparation quantitative d'acides aminés.

Les expériences précédentes montrent que l'adsorption sur le
sulfate de baryum vieilli doit permettre de séparer l'acide
aspartique des autres acides aminés; ces derniers sont, en effet,
chassés de la colonne dans des conditions où l'acide aspartique
reste adsorbé.

Pour séparer l'acide aspartique des acides aminés monocar-
boxyliques, on utilise successivement comme agents d'éluion
l'eau bidistillée (2 fois 100 cc) qui chasse les acides monocar-
boxyliques, et l'acide acétique N/50 (3 fois 100 cc) qui chasse
l'acide aspartique. Pour séparer l'acide aspartique de l'acide
glutamique, les agents d'éluion sont l'acide acétique N/1000
(4 fois 100 cc), qui chasse l'acide glutamique, et l'acide acé-
tique N/50 (3 fois 100 cc).

Conditions expérimentales : 2.5 mgr de chaque acide aminé;
37 gr d'adsorbant. Les résultats sont rassemblés dans le
tableau II.

TABLEAU II.

Séparation	Retrouvé	
	Ac. aspartique	Autre ac. aminé
Ac. aspartique — glycocölle . . .	101 %	100,5 %
Ac. aspartique — aniline + sérine + tyrosine	99,4 %	100,2 %
Ac. aspartique — ac. glutamique (3 expériences)	99,5 %	99 %
	101 %	102 %
	98 %	100,5 %

Ces propriétés permettent également d'envisager une méthode de purification poussée d'acide glutamique contenant très peu (même des traces) d'acide aspartique. En effet, si l'on filtre sur une colonne de BaSO_4 une solution d'acide glutamique contenant très peu d'acide aspartique, ce dernier sera complètement adsorbé tandis que l'acide glutamique traversera la colonne. On obtiendra donc, après filtration, de l'acide glutamique pur.

Critique.

Les deux objections principales qu'on peut adresser à notre méthode sont les suivantes :

a) les quantités fixées sont très petites, de sorte que l'erreur relative sur les dosages est assez notable (sans toutefois dépasser 2 %);

b) le fait que l'eau (ou l'acide acétique) filtrée sur la colonne fournit au dosage un résultat supérieur à un blanc normal constitue également un inconvénient, car ce phénomène parasite diminue la précision des résultats.

A cela on peut répondre que notre technique n'a nullement la prétention d'être définitive; d'ailleurs, à priori, elle semble susceptible d'un perfectionnement important. On sait, en effet, que les sels de baryum des acides aminés dicarboxyliques sont beaucoup moins solubles en milieu hydroalcoolique qu'en milieux aqueux. On peut donc prévoir que, en milieu hydroalcoolique, le BaSO_4 fixera des quantités plus grandes d'acides aminés dicarboxyliques, ce qui, non seulement augmentera la précision des dosages, mais encore diminuera l'importance relative des phénomènes parasites. On peut également espérer que, en milieu hydroalcoolique, l'acide glutamique sera également fixé par BaSO_4 , ce qui permettra sa séparation des autres acides aminés.

RÉSUMÉ.

1° L'étude de l'adsorption par BaSO_4 des acides aminés en solution aqueuse montre un parallélisme très net entre l'adsorbabilité et la solubilité du sel de Ba des acides étudiés.

2° Ces propriétés ont permis la mise au point d'une technique de séparation de l'acide aspartique des autres acides aminés. Les résultats sont quantitatifs et reproductibles. La précision est de quelques %.

3° Des perfectionnements ultérieurs de la méthode permettront sans doute d'augmenter la précision, de séparer le groupe

des acides aminés dicarboxyliques (acides aspartique, glutamique et oxyglutamique) des autres acides aminés, et de séparer les acides dicarboxyliques entre eux.

Pour terminer, qu'il nous soit permis de remercier M. le Prof^r Dubuisson, qui nous a accordé l'autorisation de travailler dans ses laboratoires et qui s'est constamment intéressé à ce travail, ainsi que M. Hamoir, son assistant, dont l'expérience et les conseils nous ont été d'un grand secours.

Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences,
Université de Liège.

BIBLIOGRAPHIE.

1. HAMOIR, *Thèse de Doctorat*, Liège. 1945.
C. R. Soc. Biol., 1943, **137**, 734.
2. KOLTHOFF, *Journ. Physic. Chem.*, 1936, **40**, 1027.
Koll. Zts., 1934, **68**, 190.
3. JONES et MOELLER, *Journ. Biol. Chem.*, 1928, **79**, 429.
4. KUHN et DESNUELLE, *Zts. physiol. Chem.*, 1937, **251**, 19.
5. FOREMAN, *Biochem. Journ.*, 1919, **13**, 388.
6. KUHN et DESNUELLE, *Ber.*, 1937, **70**, 1907.
7. WIELAND, *Naturwiss.*, 1942, **30**, 374.
8. TURBA et RICHTER, *Ber.*, 1942, **75**, 340.
9. ZECHMEISTER et CHOLNOKY, *Die chromatographische Adsorptionsmethode*.
10. ANDREASEN, *Koll. Zts.*, 1943, **104**, 181.

