

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ET TECHNIQUE OUTRE MER

SERVICE DE NORMALISATION TECHNOLOGIE
ET REPRESSION DES FRAUDES

- RAPPORT SUR LA SEMAINE D'ETUDE SUR LES METHODES

CHEMIQUES DE DOSAGE DES AMINO-ACIDES LIBRES

OU COMBINES

par

Melle C. MARTINEZ

Chef des Laboratoires du Service
de Normalisation Technologie et Répression des Fraudes

Bordeaux 23-28 Juin 1958

Semaine d'étude sur les méthodes chimiques de dosages
des amino-acides libres ou combinés

Les semaines d'étude sur tous les problèmes intéressant la nutrition ont été créées il y a dix ans par M. le Professeur TERROINE Directeur du Centre de coordination des études et recherches sur la nutrition.

D'abord créées sur le plan national elles ont lieu actuellement sur le plan international. Cette année plusieurs stages d'étude ont été organisés sur différents sujets.

La semaine organisée à Bordeaux par M. le Professeur GENEVOIX, avait pour but de faire connaître un certain nombre de méthodes chimiques de dosages des amino acides libres ou combinés - Ces méthodes sont pour la plupart employées depuis plusieurs années.

Elles ont été enseignées à Bordeaux aux séances de travaux pratiques. Beaucoup s'appliquent à des protéines purifiées et non hydrolysées.

Le stage avait lieu au laboratoire de chimie biologique et de physiologie végétale de la Faculté des Sciences de Bordeaux et le nombre des participants était limité à 16.

Chaque journée a comporté une courte conférence d'explications suivie de travaux pratiques.

L'introduction préliminaire aux méthodes de dosages a été faite par M.GENEVOIS Professeur, les démonstrations par M.J.BARAUD docteur es sciences Chef de travaux; J.LARROQUERE assistant. M.LAFON docteur es sciences, chargé de recherches au C.N.R.S. M.FLAVIER Ingénieur chimiste collaborateur technique au C.N.R.S.

Tous les dosages d'un programme précis ont été démontrés et pratiqués individuellement par les participants.

- PROGRAMME -

Lundi 23 Juin 1958

- Dosage oxydimétrique d'un mélange d'acide citrique et d'acide malique
- Dosage de l'alanine (transformation en acide lactique)

Mardi 24 juin

- Dosage des acides aspartique et glutamique
(Transformation en acide malique et succinique)

Mercredi 25 Juin

- Dosage de la lysine libre
- Dosage de la lysine dans une protéine intacte

Jeudi 26 Juin

- Dosage de la cytotéine - de l'acide thiomalique - du glutathion et de la cystéineamine

Vendredi 27 Juin

- Dosage de l'histidine et de l'histamine
- Dosages iodométriques de la tyrosine - du tryptophane de la méthionine - libres ou combinés.

Samedi 28 Juin

- Dosage de l'arginine (sur les protéines)

Les principes et les modes opératoires de ces différentes méthodes sont les suivants:

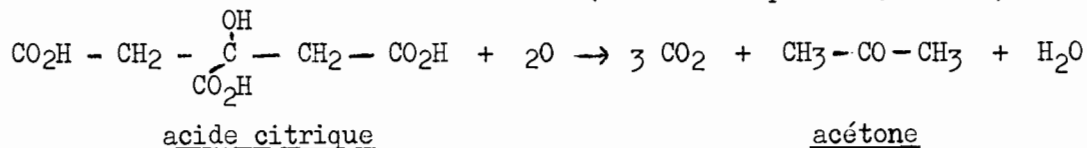
- 2 -

DOSAGE D'UN MELANGE D'ACIDE CITRIQUE ET D'ACIDE MALIQUE

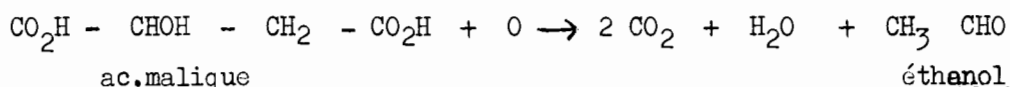
1 - Principe

Le mélange d'acide citrique et d'acide malique est soumis à l'oxydation manganique ménagée à l'ébullition dans un ballon de godet à pH 3,3

L'acide citrique donne de l'acétone (1 molécule par mol. d'acide)



L'acide malique donne de l'acétaldéhyde (éthanol: 1 mol./mol. d'ac.)



L'éthanol est titré par la méthode au bisulfite

L'acétone est titrée par iodométrie

Les prises d'essais doivent contenir de 3 à 10 mg d'acides

11 - Mode opératoire

Dans un ballon de Godet : fig (1) et fig.(2)

- + 20 cm³ de la solution d'acides
- + 10 cm³ de solution saturée phtalique - phtalate à pH 3,2 à 3,4 (1)
- + 1 cm³ de sulfate de Mn à 5%
(catalyseur d'oxydation)
- + eau → 100 cm³
- + pierre ponce

On porte à l'ébullition

On laisse alors tomber par l'entonnoir à robinet la solution de permanganate N/200 à la cadence d'une goutte toutes les 2 secondes.

L'ébullition doit être assez forte pour que l'acétaldéhyde ne se transforme pas en acide acétique.

L'opération est poursuivie jusqu'à ce que la couleur brune du liquide indique un excès d'oxydant.

En A. on recueille dans 20 cm³ de tampon phosphate pH 7 (2)
+ 5 cm³ de bisulfite à 2%.

-
- (1) solution saturée: Dans 700 cm³ d'eau 60 cm³ de NaOH N + 40 g. d'acide phtalique
Chauffer jusqu'à dissolution - laisser refroidir - vérifier le pH et l'ajuster à pH 3,3 ensuite compléter au litre.
- (2) Tampon phosphate à Ph 7 = 15 g. de PO₄ H NO₂ 2 H₂O } par litre
+ 3,35 g. de PO₄ H₂K }

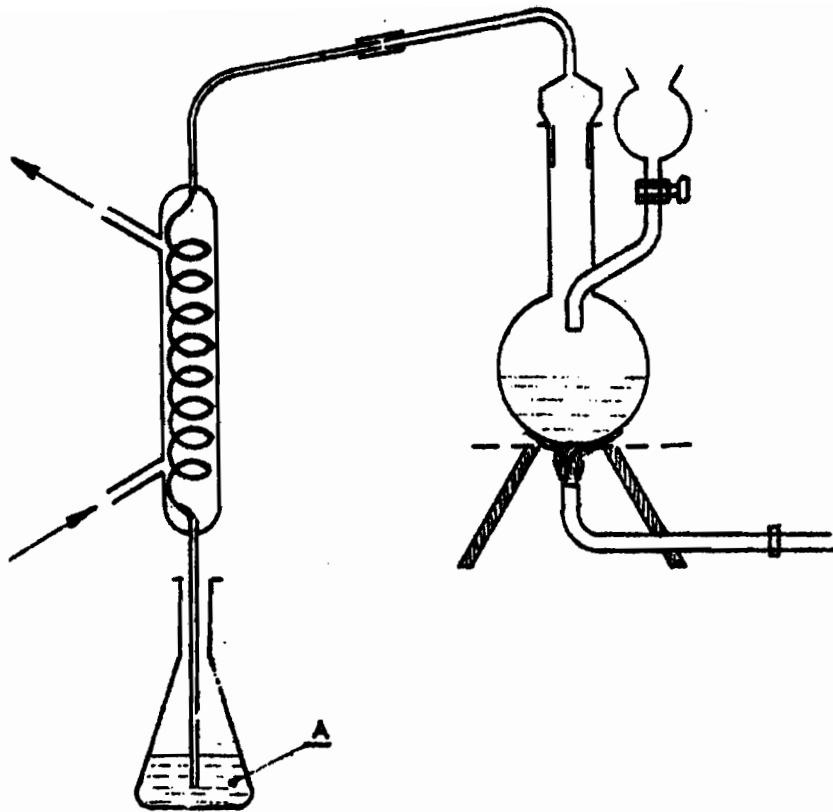


FIG. 1

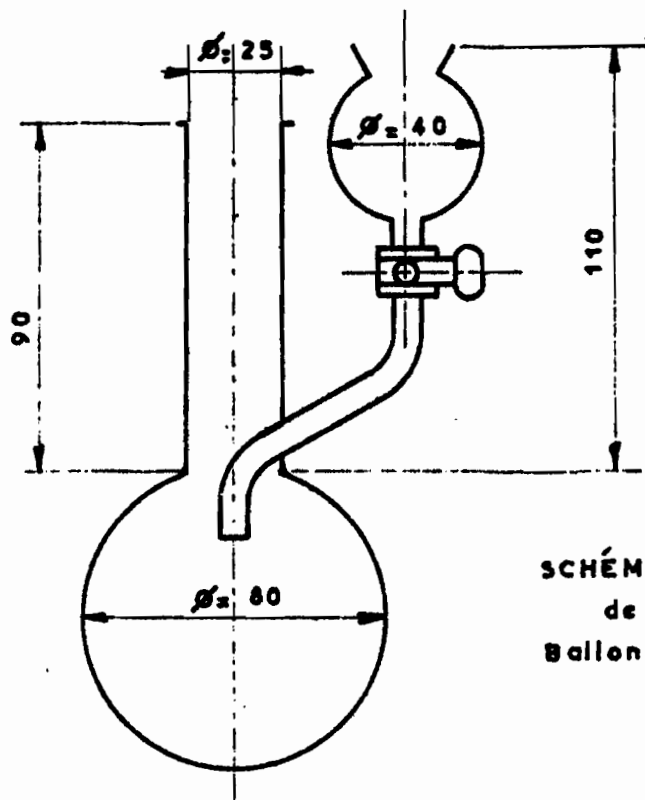


SCHÉMA du BALLON
de GODET
Ballon de 250 cm³

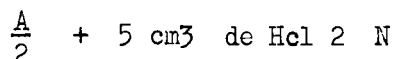
FIG. 2

Le liquide A est séparé en 2 parties.

Dans la 1ère partie on dose l'acétaldéhyde provenant de l'acide malique.

Dans la 2è partie on dose l'acétone provenant de l'acide citrique.

1ère partie - Dosage de l'acide malique



+ liqueur d'iode N/100 contenue dans une burette, en présence d'empois d'amidon jusqu'à couleur bleue.

Puis on chauffe vers 50° jusqu'à disparition de la couleur bleue (ici on détruit à chaud la combinaison bisulfite de l'acétone).

On rajoute alors à chaud la liqueur d'iode N/100 jusqu'à couleur bleue persistante.

On refroidit.

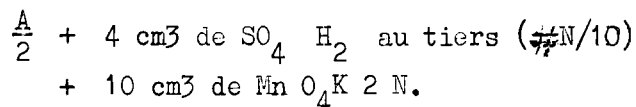
On passe alors en milieu alcalin Ph = 8,2 en ajoutant la solution alcaline boratée (30 g. d'acide borique + 40 g. de NaOH par litre) jusqu'à virage au rose pâle de la phtaléine, et on titre SO₂ H Na par l'iode N/100 contenu dans la burette - en présence d'empois d'amidon jusqu'à couleur bleue.

(titrer rapidement - le dérivé sulfite de l'acétaldéhyde n'étant pas stable en milieu alcalin).

Calculs - 1 cm³ d'iode N/100 correspond à 5 micromol. d'acide malique.

Si on a versé 16 cm³ d'iode par exemple on a dans la prise d'essai de 10 cm³ :
16 x 5 micromol. d'acide malique ou par litre de solution : $\frac{16 \times 5 \times 1.000}{10} = 8.000 \text{ micromol}$
= 8 millimol
d'ac. malique

2ème partie - Dosage de l'acide citrique



On laisse 45 minutes à froid dans le flacon bien bouché

Après ce temps on ajoute une solution saturée de sulfate ferreux jusqu'à disparition de la coloration du Mn O₄K (il y a réduction du permanganate).

On distille (dans l'appareil dessiné dans le § mode opératoire)

Le quart du liquide environ - l'Acétone distille dans 5 cm³ de NaOH 5 N.

L'acétone est titrée par iodométrie - On ajoute 50 cm³ d'iode N/100 qu'on laisse agir 20 minutes.

On passe en milieu acide + 5 cm³ de SO₄H₂ N/10 (au tiers)

On titre l'iode en excès par l'hyposulfite N/100 en présence d'empois d'amidon jusqu'à décoloration.

Calculs - Iode en excès : 19 cm³ par exemple

- Témoin: 50 cm³ d'iode sont consommés par 47 cm³ de S₂O₃ Na₂ N/100

On a donc 47-19 = 26 cm³ d'iode consommés par l'acétone

1 cm³ d'iode N correspondent à 1 milliéquivalent

1 - N/100 - à 0,01 milliéquivalent

On a : 0,01 x 26 milliéquivalents d'iode consommés

Or 1 mol. d'iode correspond à 1/6 mol. d'acétone

On a donc (0,01 x 26 x $\frac{1}{6}$) mol. d'acétone dans l'essai et dans un litre de solution.

$$\frac{0,01 \times 26 \times 1 \times 1000}{6 \times 10} = 4,3 \text{ mol. d'acétone ou d'acide citrique.}$$

*

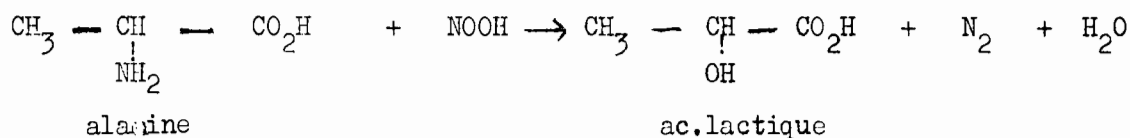
* *

Références: RIBEREAU GAYON ET PEYNAUD - Analyse et contrôle des vins
2^e édition BERANGER 1958.

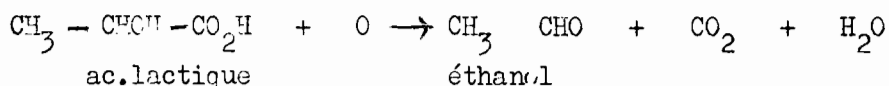
DOSAGE DE L'ALANINE - TRANSFORMATION EN ACIDE LACTIQUE

I - Principe: On ramène le dosage de l'alanine à celui de l'acide lactique en pratiquant une désamination suivant la technique de Piria.

Pour avoir une désamination quantitative et rapide à l'ébullition, l'expérience montre qu'il faut opérer en milieu sulfurique normal et ajouter goutte à goutte du nitrite de soude à 15% en grand excès par rapport aux fonctions aminées à doser mais en quantité très insuffisante pour saturer tout l'acide sulfurique. L'excès de NO_2H est détruit simplement en maintenant l'ébullition 15 mn. après la dernière affusion de nitrite.



On dose ensuite l'acide lactique formé par oxydimétrie en milieu permanganique.



L'éthanal est titré par la méthode au Bisulfite:

Formation de combinaison bisulfitique à pH = 7 - Destruction de l'excès de bisulfite par l'iode à pH = 2, libération du bisulfite combiné à l'aldéhyde à pH = 8,2 et dosage de ce bisulfite par l'iode.

II - Mode opératoire -

1) Désamination de l'alanine

Dans un ballon de Godet sans réfrigérant

- 20 cm³ de la solution d'alanine + un peu de pierre ponce
- + 10 cm³ de SO_4H_2 10 N
- + goutte à goutte 20 cm³ de Nitrite de soude à 15% (150 g. par litre)

On chauffe à douce ébullition en ajoutant le nitrite goutte à goutte
On chauffe ensuite 15 minutes pour détruire l'excès de NO_2H

On dose l'acide lactique formé par oxydimétrie.

On met le réfrigérant - on ajoute le catalyseur d'oxydation

- (+ 1 cm³ de SO_4Mn à 5 %
- (+ eau → 100 cm³
- (+ goutte à goutte MnO_4K N/100 ou N/200 à l'ébullition forte mais en allant lentement

On recueille le distillat dans 20 cm³ de tampon phosphate (15 g PO₄ H Na₂ 2H₂O)_{p.}
par litre. + (3,35g. de PO₄ H₂K)_{l.}
+ 5 cm³ de bisulfite à 2%
+ 5 cm³ de Hcl 2 N
+ iode N/100 dans une burette en présence
d'empois d'amidon jusqu'à apparition de couleur bleue.

On p... ensuite en milieu alcalin Ph = 8,2 en ajoutant la solution alcaline boratée (30 g. d'acide borique + 40 g. de NaOH par litre) jusqu'à virage au rose de la phtaléine et on titre SO₂H Na par l'iode N/100 contenu dans la burette en présence d'empois d'amidon jusqu'à couleur bleue (soit 16 cm³ d'iode) (titrer rapidement le dérivé sulfite de l'acétaldehyde n'étant pas stable en milieu alcalin).

Calculs -

1 cm³ d'iode N/100 correspond à 5 micromol d'acide lactique Si on a versé 16 cm³ d'iode par exemple on a donc la prise d'essai de 20 cm³ → 16 x 3 micromol d'acide lactique ou par litre de solution.

$$\frac{16 \times 5 \times 1000}{20} = 4000 \text{ Micromol} \\ = 4 \text{ millimol d'acide lactique ou d'alanine}$$

*

*

*

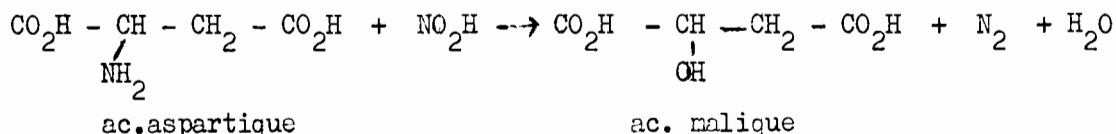
DOSAGE DES ACIDES ASPARTIQUES ET GLUTAMIQUES - TRANSFORMATION EN ACIDE MALIQUE
ET SUCCINIQUE

1) Principe

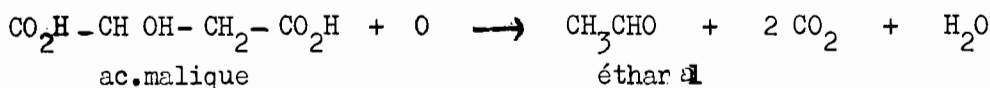
On ramène les dosages des acides aspartiques et glutamiques à ceux des acides maliques et succiniques en pratiquant une désamination suivant la technique de Piria.

On opère en milieu sulfurique et on ajoute goutte à goutte à l'ébullition du nitrite de soude en grand excès par rapport aux fonctions aminées à doser mais en quantités très insuffisantes pour saturer tout l'acide sulfurique.

L'excès de NO_2H est détruit simplement en maintenant l'ébullition 15 mn. après la dernière affusion de nitrite.

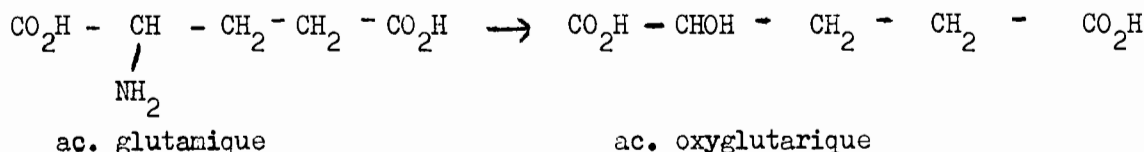


On dose ensuite l'acide malique formé par oxydimétrie en milieu permanganique

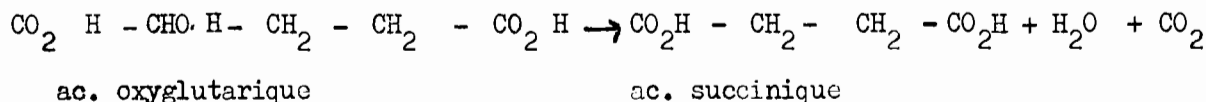


L'éthanal est ensuite dosé par la méthode au bisulfite

Pour l'acide glutamique on a:



Une oxydation permanganique transforme celui-ci en acide succinique que l'on dose par la méthode classique au sulfocyanure.



11 - Mode opératoire

Dosage de l'acide glutamique

La prise d'essai doit contenir de 100 à 500 micromolécules d'acide glutamique.

Dans un ballon à distiller de 250 cm³

- { 50 cm³ de solution d'acide glutamique
- { + 1 cm³ de SO_4H_2 10 N.
- { + 10 cm³ de MnO_4K saturé (2 N)

On fait bouillir 15 minutes exactement à l'air libre.

On détruit l'excès de MnO_4K (après avoir refroidi) par du bisulfite concentré SO_3HNa

On neutralise SO_4H_2 par $\text{KOH} - 10 \text{ N}$ en présence de thymol sulfophtaléine (virage du rose \rightarrow jaune à Ph 1,9)

On évapore presque à sec mais pas tout à fait.

On ajoute 250 cm^3 d'éther - on décante - on recueille l'éther et on le distille après avoir ajouté 10 cm^3 d'eau.

L'acide succinique reste dans les 10 cm^3 d'eau - après distillation de l'éther.

On neutralise exactement par $\text{NaOH N}/10$ en présence de phénolphtaléine.

- + $\frac{1}{2}$ goutte d'acide acétique $\text{N}/10$
- + 50 cm^3 de nitrate d'argent $\text{N}/10$

On complète à 100 cm^3 dans une fiole jaugée et on attend 15 minutes. On a un précipité de succinate d'Ag. On agite et on filtre seulement 50 cm^3 du filtrat. On ajoute 2 cm^3 de NO_3H pur. + 1 cm^3 d'une solution d'alun ferrique

On titre par le sulfocyanure de potassium $\text{N}/20$ jusqu'à coloration rouge.

Calculs

On verse $37,2 \text{ cm}^3$ de sulfocyanure par exemple.

On a : $50 - 37,2 = 12,8 \text{ cm}^3$ de $\text{NO}_3 \text{ Ag N}/10$

$$1 \text{ cm}^3 \text{ de } \text{NO}_3 \text{ Ag N}/10 = \begin{matrix} \text{consommés} \\ \text{mil.} \\ \text{de } \text{NO}_3 \text{ Ag.} \end{matrix} = 0,1 \text{ Eq.} = \begin{matrix} \text{mil.} \\ \text{de } \text{NO}_3 \text{ Ag.} \\ \text{d'acide Succinique} \end{matrix} = 0,05 \text{ Eq.}$$

contenus dans 50 cm^3 de solution

On a donc:

$$\frac{12,8 \times 0,05 \times 1000}{50} = 12,8 \text{ Eq. d'acide succinique par litre de solution}$$

Dosage de l'acide aspartique

On neutralise par $\text{NaOH N}/10$ après désamination en présence de bromophénol bleu.

Précaution: ne pas ajouter trop de soude pour ne pas précipiter le manganèse du catalyseur d'oxydation.

On fait l'oxydation permanganique dans un ballon de Godet comme il est indiqué dans le chapitre "Dosage d'un mélange d'acide citrique et d'acide malique". et on continue comme il est indiqué dans ce dosage avec la différence suivante: Il est inutile de chauffer à 50° comme il est indiqué, car on n'a pas d'acide citrique.

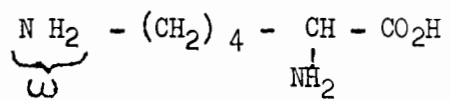
*

* *

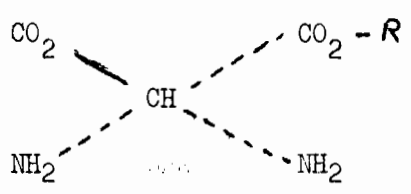
DOSAGE DE LA LYSINE LIBRE

1) Principe du dosage

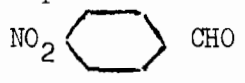
La lysine est un acide aminé basique



On forme le complexe cuprique sur la fonction acide



On le complexe ensuite avec une aldéhyde aromatique: soit la nitrobenzaldéhyde



à raison de 1 molécule d'aldéhyde pour une mol. de lysine - On a un complexe insoluble - que l'on sépare - purifie et redissous dans Hcl dilué.

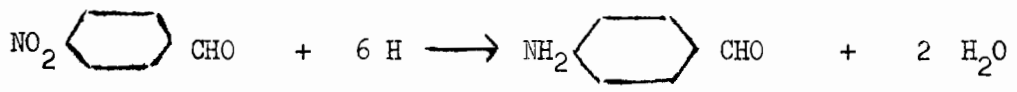
L'acide chlorhydrique le décompose en ses 3 constituants - cuivre - lysine - et aldéhyde.

On peut alors doser: soit l'aldéhyde
soit le cuivre

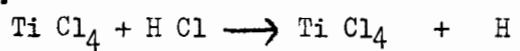
11) Mode opératoire

Dosage de l'aldéhyde

On fait un dosage titanométrique



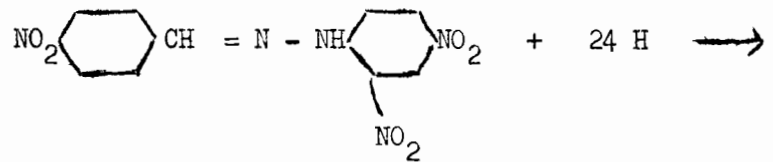
en milieu:

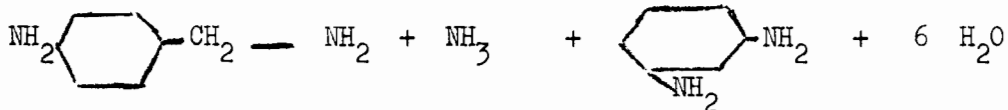


Cette réaction d'hydrogénation se fait de préférence en para - C'est pourquoi on a choisit la paranitrobenzaldéhyde.

On doit travailler en atmosphère de CO2 avec des burettes automatiques - La réaction est très sensible.

Avec de très faibles quantités de lysine on emploie de la di nitrophénylhydrazone

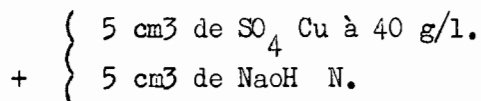




On a 24 hydrogènes pour 1 mol. de lysine.

Dosage du cuivre -

a) Formation de l'hydroxyde de cuivre -



On filtre - On élimine l'excès de soude par lavage.

b) 20 cm³ de solution de lysine à Ph = 8 (ajustée au pH mètre)

+ le précipité de Cu (OH)₂ ramassé avec un agitateur

On mélange et on laisse 10 minutes

On filtre pour éliminer l'excès de Cu (OH)₂ et on passe au complexe aldéhydique

c) On prend la moitié du volume initial (Soit 10 cm³ = $\frac{V}{2}$)

+ 5 cm³ d'alcool à 95°

+ 5 cm³ de nitrobenzaldéhyde à 2% dans l'alcool

On ajuste à pH = 8,9 avec NaOH N/10

au pH mètre ou avec la thymolsulfonephtaléine

(jaune → bleu à pH 8,9) Le précipité est gris

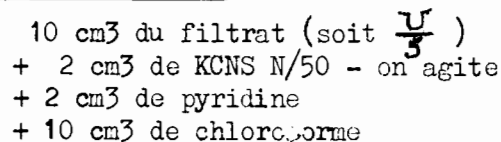
On laisse 1 heure. Si le précipité devient blanc. On rajoute une goutte de soude.

d) On filtre le précipité et on lave plusieurs fois avec l'alcool à 50° - On élimine ainsi l'excès de paranitrobenzaldéhyde.

Sur le filtre on ajoute 5 cm³ de Hcl N/10

On recueille dans une fiole jaugée de 25 cm³ et on complète à 25 cm³.

e) Dosage du cuivre -



On a une coloration verte qu'on spectrophotométrie à 720 mμ

On trouve ainsi - 20 mg de lysine dans l'échantillon de départ.

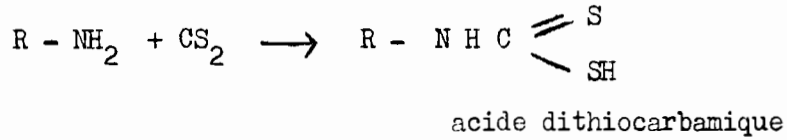
*

* *

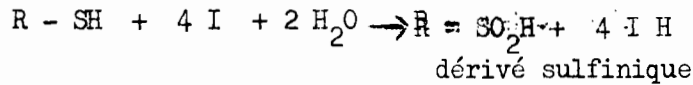
DOSAGE DE LA LYSINE DANS UNE PROTEINE INTACTE

1 - Principe

En milieu alcalin le sulfure de carbone réagit sur les amines primaires selon la réaction d'Hoffmann pour donner un dérivé dithiocarbamique



que l'on peut doser par l'iode.



On titre de cette manière tous les NH₂ libres de la protéine.

On titre ainsi les NH₂ en position ω de la lysine

et les NH₂ - α terminaux dans la protéine

Mais ceux-ci ne constituent que 0,2 à 0,4 % de la protéine par rapport à la lysine.

Précaution: Si on fait tomber l'iode dans le dithiocarbamate - la réaction est lente; au contraire lorsqu'on fait tomber le dithiocarbamate dans l'iode la réaction est rapide et on a donc intérêt à opérer de cette façon.

11 - Mode opératoire

20 cm³ d'une solution de caséine à 2,5 g/litre

+ 5 cm³ d'une solution N de tampon boratée à Ph = 9,2 - 9,5

+ 5 cm³ de S₂C.

On laisse au bain marie 2 heures à 55° avec réfrigérant à reflux.

On laisse refroidir.

Dans une ampoule à décantation on enlève le sulfure de carbone (couche inférieure)

Dans un flacon bouché émeri contenant 25 cm³ d'iode N/100
+ 10 cm³ d'acide acétique pur, on verse le liquide qui se trouve dans l'ampoule.

Puis on agite 20 minutes dans le flacon bouché avec un agitateur magnétique.

On verse 25 cm³ d'hyposulfite N/100 - on agite 5 minutes et on titre l'excès d'hyposulfite par l'iode N/100.

On fait également un témoin:

- (20 cm³ de caséine
- (+ 25 cm³ d'iode N/100
- (+ 10 cm³ d'acide acétique pur

On attend 20 minutes en agitant.

+ 25 cm³ d'hyposulfite N/100

On attend de nouveau 5 minutes

Calculs

Nous avons versé pour l'essai 11 cm³ d'iode N/100
pour le témoin 2 cm³

On a donc:

11 cm³ de I N/100 pour la lysine + autres acides aminés
2 cm³ de I N/100 pour les autres acides aminés

soit: 9 cm³ de I N/100 pour la lysine seule

9 cm³ d'iode N/100 consommés correspondent à 10 x 9 micro équivalents donc
à $\frac{10 \times 9}{4}$ micromolécules de R - NH₂.

On aura donc $\frac{10 \times 9}{4} \times 0,146$ mg. de lysine qu'on rapporte à 100 g. de protéine.

soit 3,29 mg de lysine

Dans 20 cm³ de solution de caséine à 2,5 g/litre on a 50 mg de caséine.

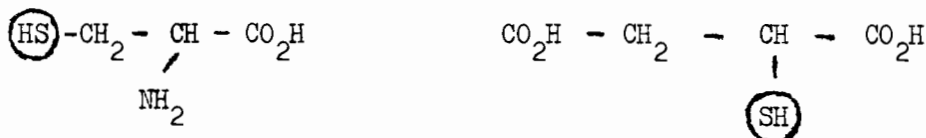
On avait donc 6,58% de lysine, dans la caséine.

*

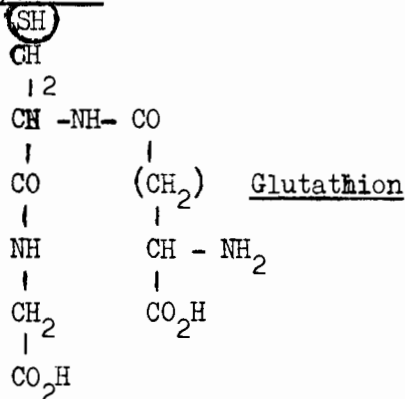
* *

DOSAGE DE LA SYSTEINE - DE L'ACIDE THIOMALIQUE ET DU GLUTATHION

1) Principe



Cystéine



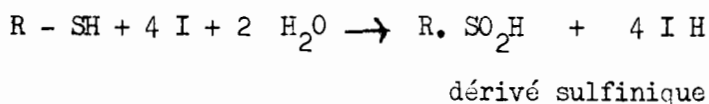
On utilise l'aptitude réactionnelle d'un groupe SH vis-à-vis d'oxydants tels que: iode) - (dichlorophénol - indophénol.)

L'oxydation se fait aux dépends de l'eau, le groupe SH devenant SO H, SO₂H ; SO₃H.

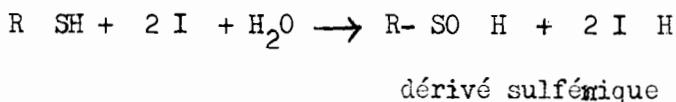
Dosage du groupe SH par l'iode

On introduit le dérivé sulfhydrylé goutte à goutte dans une solution d'iode N/100 en excès. On constate une réduction partielle et rapide de l'iode. L'iode est titré en retour par une solution S₂ O₃ Na₂ N/100.

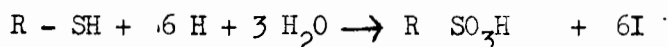
à Ph = 3 la systéine consomme 4 iodes par molécule



à PH = 6 le glutathion - la cystéine consomment 2 iodes par molécule.



à Ph = 6 l'acide thiomalique consomme 6 iodes par molécule



(1) Dosage de la Cysteine (1)

Dans un flacon émeri de 250 cm³ on met 25 cm³ d'iode N/100 acidifiés par 5 cm³ de CH₃ CO₂ H pur.

Puis on fait tomber goutte à goutte et en agitant sur agitateur magnétique, 5 cm³ d'une solution de cystéine (au maximum M/200) On laisse réagit 20 minutes, puis on titre l'excès d'iode par l'hyposulfite en présence d'empois d'amidon.

On fait dans les mêmes conditions un témoin en remplaçant la cysteine par 5 cm³ d'eau distillée.

Calculs -

Nombre de cm³ d'hyposulfite versés pour l'essai: 13 cm³
" " " " pour le témoin 24,6 cm³

cm³ d'iode consommés par la cystéine = cm³ d'hyposulfite consommés

soit 24,6 - 13 = 11,6 cm³ c'est-à-dire $\frac{11,6}{100}$ millimol. d'iode.

Or 1 cystéine correspond à 4 iodes.

On a donc: $\frac{11,6}{400}$ mil. mol. de cystéine dans l'essai

Et dans un litre de solution de cystéine on a:

$$\frac{11,6 \times 200}{400} = 5,8 \text{ milmol de cystéine}$$

(2) Dosage de l'acide thiomalique

Dans un flacon émeri de 250 cm³ on met 50 cm³ d'iode N/100 + 5 cm³ de tampon citrique N à Ph = 6

On fait tomber goutte à goutte en agitant 5 cm³ de solution de thiomalate (au maximum M/200) on laisse réagir 20 minutes.

Puis on titre l'excès d'iode par S₂O₃^{Na2} (N/100) en présence d'empois d'amidon.

On fait un témoin dans les mêmes conditions.

Calculs -

Nombre de cm³ d'hyposulfite versés pour l'essai: 34 cm³
" " " " pour le témoin: 49 cm³

cm³ d'iode consommés par l'ac. thiomalique = cm³ d'hyposulfite consommé
soit: 49-34 = 15 cm³ c'est-à-dire $\frac{15}{100}$ millimol. d'iode

Or 1 acide thiomalique correspond à 6 iodes

On a donc : $\frac{15}{600}$ millimol. d'acide thiomalique dans l'essai

Et dans un litre de solution d'acide thiomalique on a:

$$\frac{15 \times 200}{600} = 5 \text{ milmol. d'ac. thiomalique}$$

3) Dosage du glutathion dans un bouillon de levure:

Dans un flacon émeri de 250 cc on met 20 cm³ de dichlorophénol-indophénol N/500 (tamponné à Ph = 7) puis goutte à goutte en agitant, 5 cm³ de bouillon de levure. Attendre 20 minutes - On titre l'excès de réactif par SO₄ Fe N/500

On trouve ⁿ cm³ de sulfate de fer

On a (20 - n) cm³ de colorant N/500 consommé

Essai témoin → On opère de même mais avec 5 cm³ de Bouillon de levure dans lequel le glutathion aura été préalablement bloqué par 1 cm³ de bromacétate de Na N/5 en milieu bicarbonaté en 15 minutes.

Soit (20 - M) cm³ de colorant N/500 consommé

La différence M - n correspond au glutathion.

*

* *

DOSAGE DE L'HISTIDINE

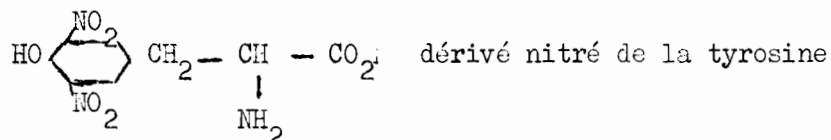
1) Principe

On dose l'histidine par colorimétrie après formation d'un diazoïque, d'après la réaction de diazotation de PAULI.

L'inconvénient dans ce dosage est la présence de tyrosine. On supprime l'action de la tyrosine - soit par nitration préalable, soit par action directe du chlorure de diazonium de la parabromaniline.

a) Nitration

Le mélange tyrosine histidine, est traité par NO_3H au $\frac{1}{2}$ à l'ébullition - Il se forme un dérivé jaune de la tyrosine.



On traite ensuite par le chlorure de diazonium de la parabromaniline.

L'histidine donne un dérivé rouge orangé.

On sépare les 2 dérivés par leur solubilité différente dans le pentanol - le dérivé jaune de la tyrosine étant insoluble dans celui-ci.

b) action directe du chlorure de diazonium de la parabromaniline

On a un dérivé rouge orangé de l'histidine et un dérivé de la tyrosine. On sépare les deux par le pentanol.

II Mode opératoire

Dosage de l'histidine en solution pure par diazotation directe -

a) préparation du chlorure de diazonium de la parabromaniline

Ce mélange se fait dans la glace et doit être conservé à 0° Il est préparé au moment de l'emploi car sa durée de conservation est faible.

Dans un tube à essai.

10 cm ³ de parabromaniline M/2 dans HCl N/10	}	Dans la glace 15 minutes
+10 cm ³ de NO ₂ Na à 1 g/litre		
+ 2 cm ³ de HCl N/10		

b) dans un autre tube à essai

5 cm³ de solution d'histidine de 4 à 20 mg/ litre
+ 2 cm³ de chlorure de diazonium fraîchement préparé
+ 2 cm³ de solution alcaline boratée à PH 9,4
(40 g de NaOH/litre + 30 g de BO₃H₃).

On laisse au bain de glace 30 minutes

On a une coloration jaune.

c) Dans une ampoule à décantation - on rince le tube avec 2 à 3 cm³ d'eau + 20 cm³ de pentanol . La couleur passe dans le pentanol . On compare à des étalons au spectrophotocolorimètre à 546 mμ

Dosage de l'histidine dans une protéine

a) préparation du chlorure de diazonium de la parabromaniline

Dans un tube à essai et dans le bain de glace

5 cm³ de parabromaniline M/1000
+ 1 cm³ de nitrite de soude à 1 g. par litre } on laisse 15 minutes

b) Dans un autre tube à essai

3 cm³ d'eau
+ 5 cm³ de solution de caséine(1)
+ 1 cm³ de solution alcaline boratée à PH = 9,4

On laisse une heure Dans ces conditions la tyrosine ne réagit pas - On a une coloration non extractible par le pentanol.

On dilue de moitié et on fait la lecture directement au spectrophotocolorimètre

Dosage d'un mélange d'histidine et d'histamine

On se place en milieu alcalin - Dans ces conditions l'histidine est bloquée et ne peut être extraite par le pentanol.

Dans une ampoule à décantation.

5 cm³ de solution d'histidine et d'histamine
+ 2 cm³ de KOH 5 N.

Extraire 3 fois par 5 cm³ de pentanol - en ayant soin d'ajouter quelques cristaux de Cl Na pour empêcher l'émulsion.

On décante et on reprend les 15 cm³ de pentanol par 5 cm³ de HCl N/10.

On décante de nouveau et on prend 2 cm³ de la couche chlorhydrique.

2 cm³ de cette solution
+ 2 cm³ de CO₂Na₂ anhydre à 10 g/litre
+ 1 cm³ de chlorure de diazonium N/200 préparés comme pour l'histidine pure.

Si on a apparition d'une coloration rouge orange on a de l'histamine que l'on dose alors colorimétriquement (2)

(1) la solution de caséine est préparée de la manière suivante

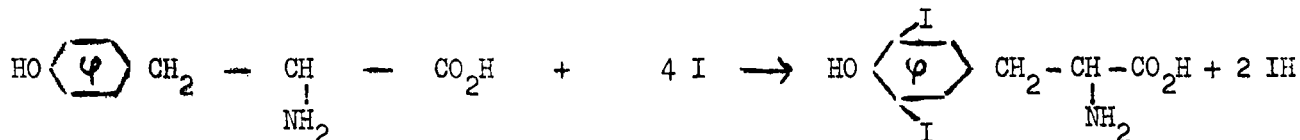
{ 1 g de caséine (de 20 mg à 1 g par litre pour la gamme d'étalonnage)
{ + 100 cm³ d'eau
{ + 10 cm³ de CO₂Na₂ anhydre
{ + eau jusqu'à 100° cc.
{ On agite jusqu'à limpidité

(2) Dosage colorimétrique de l'histamine par Jacques BARAUD et L.GE.EVOIS, Bull.Soc.chim.France 1956

DOSAGE PAR L'IODE DE LA TYROSINE DU TRYPTOPHANE ET DE LA METHIONINE

1 - Principes du dosage

1) La tyrosine La tyrosine, en présence d'un excès d'iode, donne un dérivé dans lequel 2 iodes sont substitués sur le noyau: la 3, - 5 diiodotyrosine



Cette réaction est fortement influencée par le Ph.

Le temps de $\frac{1}{2}$ réaction est de l'ordre de 15 minutes pour Ph = 6 - 6,2 . Pour des Ph inférieurs la réaction est beaucoup plus lente et pratiquement nulle au dessous de Ph = 4

Pour des Ph supérieurs la réaction est rapide mais la quantité d'iode consommé est très supérieure à la quantité théorique, il y a formation d'iodamines et d'autres réactions. Pour Ph = 6 - 6,2 la réaction est terminée à 1% près au bout de 2 heures.

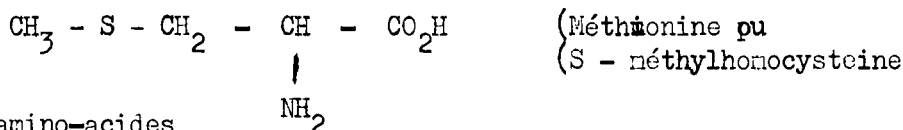
2) Le tryptophane consomme lui aussi des quantités notables d'iode (6 atomes d'iode par molécule) mais il ne se fait pas de dérivés de substitution comme dans le cas de la tyrosine. Il y a destruction de la molécule, et les 6 iodes se retrouvent à l'état de IH.

La réaction est très rapide - presque instantanée, et n'est que peu influencée par le Ph du moins entre Ph = 4 et Ph = 6

En milieu plus acide elle se ralentit, pour être pratiquement nulle à Ph = 1,0 à 20°.

3) La méthionine - La méthionine en milieu neutre donne un complexe avec 2 atomes d'iode, lesquels sont libérés quand on repasse en milieu acide.

Le complexe iodométhionine se forme encore pour les Ph de 4 à 6.



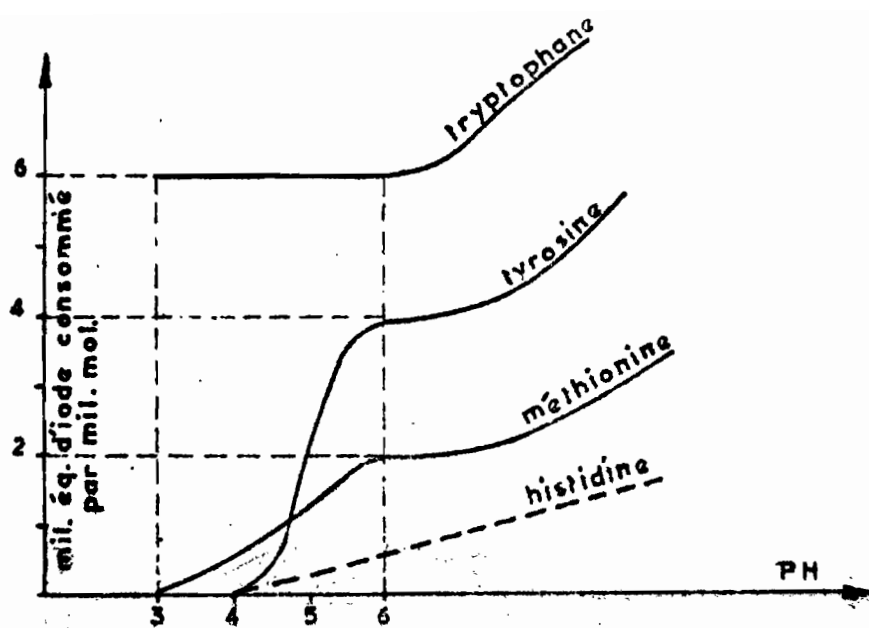
4) Les autres amino-acides
(gr. 1 et 2)

a) cystéine et homocystéine; réagissent avec l'iode qui oxyde la fonction - SH. On bloque la cystéine par la bromacétate de Na et on élimine ainsi cette cause d'erreur.

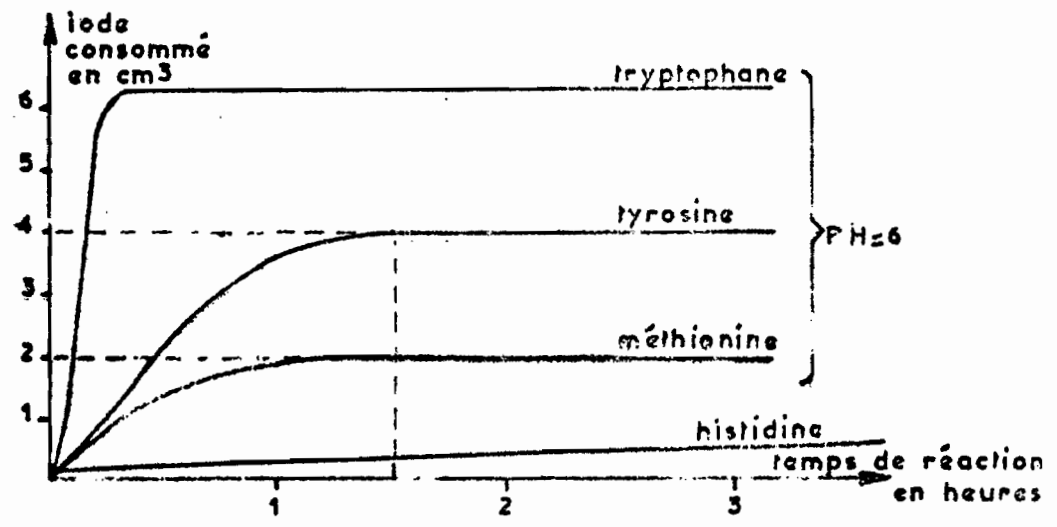
b) Histidine susceptible de fixer 2 iodes sur la double liaison du noyau imidazol. Entre PH₄ et PH₆ cette réaction est lente et en 2 heures à PH = 6 l'histidine ne fixe que 10% de la quantité théorique d'iode.

A ces PH la réaction est proportionnelle au temps.

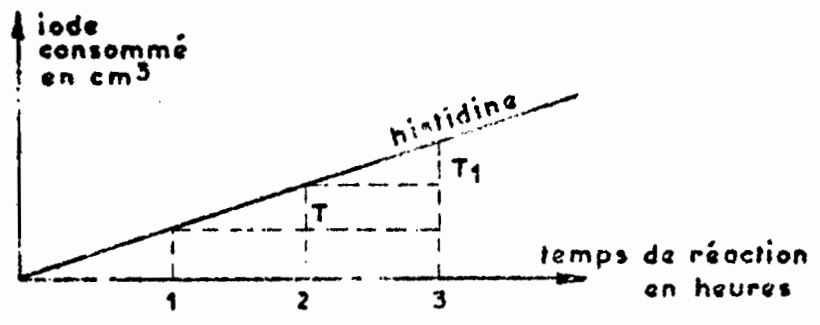
c) les autres amino-acides (alanine-leucine-phénylalanine-arginine-lysine-asparagine-acide aspartique-acide glutamique -sérine-thréonine) ne consomment pas d'iode, en 2 heures à 20° à PH 4 ou 6.



GRAPHIQUE 1



GRAPHIQUE 2



GRAPHIQUE 3

11 Mode opératoire

1) Iode consommé par la somme tryptophane

+ tyrosine)
+ méthionine)
+ histidine)

Dans un flacon émeri à large col de 250 cc on met 10 cm³ de tampon citrique N à PH = 6,0 - 6,2

+ 10 cm³ de la solution à doser
+ 50 cm³ d'iode N/100

On laisse réagir 2 heures puis on titre l'iode en excès par S₂O₃ Na₂ N/100

Soit T cm³ l'iode consommé

2) Iode consommé par la méthionine

Dans le flacon précédent après avoir ajouté T cm³ on ajoute ensuite 5 cm³ de HCl au $\frac{1}{2}$ pour passer en milieu acide (PH = 1) L'iode lié à la méthionine est entièrement libéré au bout de 10 minutes à 20°. On titre alors par S₂O₃ Na₂ N/100. soit M cm³ correspondant à la méthionine

3) Iode consommé par le tryptophane

Dans un flacon émeri de 250 on met : 10 cm³ de tampon citrique à Ph 4
+ 10 cm³ de la solution à doser
+ 50 cm³ d'iode N/100

On laisse réagir 2 heures

On acidifie par Hcl pur 2 cm³ on attend 10 minutes et on titre l'excès d'iode par S₂O₃ Na₂ N/100 en opérant très rapidement

soit N cm³ d'iode consommé

4) Iode consommé par l'histidine

Dans un flacon de 250 cc on met : 10 cm³ de tampon citrique N PH = 6 - 6,2
+ 10 cm³ de la solution à doser
+ 50 cm³ d'iode N/100

On laisse réagir 3 heures au lieu de 2 heures

Soit T₁ la quantité d'iode consommé

2 (T₁ - T) représente l'erreur due à l'histidine à retrancher de T d'après le schéma suivant (graphique 3)

N.B. Pour éliminer l'erreur due à la cystéine - voir dosage de la cystéine.
Pour avoir un dosage correct - utiliser un excès d'iode égal au moins à la quantité d'iode totale fixée - Dans les conditions décrites ici il faut avoir 50 \gg 2 T.

111 Calculs -

1) Si $T = 21,9 \text{ cm}^3$

Le nombre de cm^3 d'iode consommés par le mélange est $50 - 21,9 = 28,1 \text{ cm}^3$.

2) Le nombre de cm^3 d'iode consommés par la méthionine est $M = 6,1 \text{ cm}^3$

3) Le nombre de cm^3 d'iode consommés par le tryptophane est (Si $N = 31,2$)
 $50 - 31,2 = 18,8 \text{ cm}^3$

4) La tyrosine a donc consommé:

$$28,1 - 6,1 - 18,8 = 3,2 \text{ cm}^3$$

Méthionine

$$6,1 \text{ cm}^3 = 61 \mu \text{ éq.} = \frac{61}{2} = 30 \mu \text{ mol.} = 3,05 \text{ mmol./litre}$$

Tryptophane

$$18,8 \text{ cm}^3 = 188 \mu \text{ éq.} = \frac{188}{6} = 31 \mu \text{ mol.} = 3,1 \text{ mmol./litre}$$

Tyrosine

$$3,2 = 32 \mu \text{ éq.} = \frac{32}{4} = 8 \mu \text{ mol} = 0,8 \text{ mmol./litre}$$

*

* *

Pour avoir la quantité d'arginine on doit déduire l'ammoniaque libéré par les fonctions amidées.

Dosage de l'azote amidé

On fait une hydrolyse en milieu acide

Dans un ballon de 250 cm³ avec réfrigérant à reflux

1 g. de gluten + 100 cm³ de HCl N.

On fait bouillir pendant 1 heure.

On neutralise par la magnésie en présence de phénolphtaléine

On distille ensuite l'ammoniaque retenu sous forme de chlorure d'ammonium.

On le recueille dans HCl N/10 pendant $\frac{1}{2}$ heure

On titre ensuite l'excès de HCl N/10 par NaOH N/10

Dans ce mode opératoire la difficulté est de ne pas mettre un excès de magnésie - et de chauffer très doucement pour distiller l'ammoniaque. On doit éviter la formation de mousses qui risquent de faire éclater le ballon.

Dans le cas de mousses on doit arrêter immédiatement le chauffage.

Renseignements complémentaires

- - - - -

Extraction des protéines végétales

Exemple - Extraction des protéines des feuilles vertes.

On met les feuilles dans un bocal fermé avec un peu d'éther éthylique restifié - On laisse 1/4 d'heure.

L'éther dissout l'enduit cireux des feuilles et éthérolyse les tissus.

On effectue un pressage.

Les chloroplastes passent très peu. La chlorophylle reste dans la feuille. Les protéines cellulaires passent avec l'éther. On filtre sur toile de nylon fine.

On distille l'éther - 80% des protéines de la feuille sont extraites par ce procédé.

On les purifie ensuite par les méthodes classiques (précipitation par le sulfate d'ammonium ou l'alcool à 80 % ou l'acide chloracétique).

*

* * *

CONCLUSION

Actuellement les méthodes appliquées au laboratoire de normalisation pour le dosage des acides aminés sont des méthodes de chromatographie bidimensionnelle sur papier, méthodes qui dosent simultanément 10 acides aminés à la fois. Sauf le tryptophane que l'on dose isolément par colorimétrie.

Dans certains cas il est intéressant de vérifier certains résultats douteux ou anormaux sans recommencer l'analyse chromatographique complète.

La semaine d'étude sur les méthodes chimiques de dosage des amino-acides nous a apporté de nombreux renseignements qui donnés par des spécialistes nous éviteront de tâtonner.

Cependant on doit signaler ici que le dosage chimique de certains acides aminés comme les leucines - isoleucines la phénylalanine et la valine n'est pas encore au point et ne nous a pas été enseigné.

On doit signaler également que certains acides aminés comme le tryptophane, - pour lequel la méthode chimique colorimétrique employée actuellement au laboratoire ne donne pas entière satisfaction, - sont très difficiles à doser par cette voie.

En effet le dosage du tryptophane doit être fait très rapidement et présente des difficultés telles que les résultats trouvés par les 16 participants ont été tout à fait disparates.

D'autres acides aminés comme l'acide aspartique dont le dosage revient à un dosage d'acide malique sont très difficiles à réunir et demandent une grande expérience. Nous ne pouvons donc pas les adopter pour le moment.

L'application des autres dosages doit être faite sur des protéines pures ou hydrolysées et le dosage d'un acide aminé prend alors isolément beaucoup de temps.

Il reste à noter que les participants, d'une manière générale préfèrent de beaucoup les méthodes de chromatographie sur papier relativement plus rapides et plus complètes.

Nous ne considérerons donc ces dosages que comme des méthodes de vérification, mais non des dosages applicables à toute la gamme des acides aminés actuellement dosés au laboratoire par chromatographie sur papier.

*

* *



LE CHEF DU SERVICE DE NORMALISATION TECHNOLOGIE ET REPRESSION DES
FRAUDES

Melle MARTINEZ a bien employé le temps qu'elle a passé au Laboratoire de chimie biologique et de physiologie végétale de la Faculté des Sciences de Bordeaux.

Tous les travaux de laboratoire qu'elle a exécutés, toutes les notes qu'elle a prises au cours de la semaine d'étude, tous les enseignements qui lui ont été donnés vont lui être très utiles pour la poursuite des études, entreprises depuis quelques années dans les laboratoires du Service de Normalisation Technologie et Répression des Fraudes, sur le dosage des amino-acides par chromatographie sur papier.

Cette confrontation des méthodes chimiques avec la méthode par chromatographie sur papier, pour le dosage des amino-acides, était nécessaire; elle nous a permis de constater que la seconde méthode est susceptible de nous donner, dans l'état actuel de nos connaissances, des résultats très suffisants et valables.

Il ne semble pas qu'actuellement nous ayons intérêt à abandonner cette méthode au profit des méthodes chimiques qui paraissent avoir besoin d'une sérieuse mise au point.

Le 7 Novembre 1958

LE CHEF DU SERVICE DE NORMALISATION TECHNOLOGIE
ET REPRESSION DES FRAUDES

M. PIELLARD