

PHÉNOMÈNES IONIQUES MODIFIANT LE PARTAGE DANS LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

FRANÇOIS MIRANDA ET SERGE LISSITZKY

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille (France)

Les différents facteurs impliqués dans la chromatographie sur papier ont été analysés par MARTIN¹ qui distingue le partage vrai, prédominant dans la plupart des cas, de facteurs secondaires tels que l'adsorption² ou l'échange d'ions dû aux carboxyles du papier³ dont l'importance peut être exaltée dans certaines circonstances. Sans aborder ici les problèmes liés à l'adsorption, nous rapporterons quelques expériences montrant l'influence de l'état d'ionisation des substances chromatographiées sur l'allure du phénomène de partage.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

La chromatographie a été réalisée sur l'extrait acétique d'un broyat de muscles de scorpions (*Androctonus australis* L.)⁴ suivi d'un dessalage à l'alcool et de concentration sous vide jusqu'à consistance sirupeuse.

Les composés guanidiques témoins: arginine, agmatine, arcaïne, méthylguanidine et l'acide γ -guanidobutyrique provenaient de Hoffmann-La Roche.

Les solutions d'indicateurs nucléaires renfermaient:

(1) ²²Na (A.S.: 1 mC/mmole) contenu soit dans la solution d'origine renfermant 0.039 μ équiv./ μ l de ²²NaCl et 0.039 μ équiv./ μ l de HCl, soit dans la même solution exactement neutralisée à pH = 7.0 et contenant 0.044 μ équiv./ μ l de ²²NaCl d'A.S.: 0.5 mC/mmole.

(2) ³⁶Cl (A.S.: 0.001 mC/mmole) utilisé soit sous la forme de la solution d'origine: H³⁶Cl (0.58 μ équiv./ μ l) soit sous celle d'une solution neutralisée par NaOH et contenant 0.36 μ équiv./ μ l de Na³⁶Cl.

Des volumes de 1 à 30 μ l de ces solutions ont été utilisés pour la chromatographie sur papiers Whatman No. 1 ou 4 préalablement lavés ou non selon la technique de KAY, HARRIS ET ENTENMAN⁵ par capillarité descendante dans une cuve de verre.

Les solvants utilisés ont été: *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17 et 73:10:17) (BA 5 et BA 10); pyridine-alcool isoamylique-acide acétique-eau (80:40:10:40) (Pyridine); eau bidistillée dans un appareil entièrement en verre Pyrex.

La révélation des chromatogrammes a été réalisée: (a) soit avec des indicateurs de pH: vert de bromocrésol (VB) (0.04% dans l'éthanol à 95°), hélianthine (0.02% dans l'éthanol à 60°), rouge de phénol (0.02% dans l'éthanol à 95°), (b) soit avec des réactifs spécifiques: de SAKAGUCHI⁶ pour les dérivés guanidiques monosubstitués, AgNO₃ 0.1 N pour Cl⁻, acétate d'uranyle et de zinc selon FEIGL⁷ pour Na⁺ et forma-

tion de phosphomolybdate réduit pour PO_4^{3-} selon POLLARD ET McOMIE⁸, (c) soit par autoradiographie des chromatogrammes avec des films X-ray no screen Kodak.

RÉSULTATS

Le chromatogramme de l'extrait naturel de muscle de scorpions, riche en sels, réalisé en butanol-acétique et révélé au réactif de SAKAGUCHI montre (Fig. 1), à côté de spots ovalaires dont les R_F sont très voisins de ceux des composés de référence, des taches en forme de V traduisant une perturbation du processus de chromatographie.

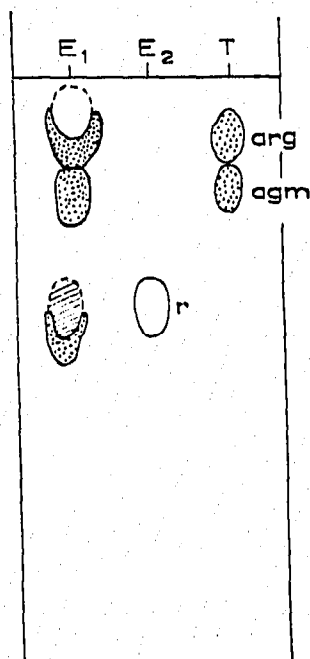


Fig. 1. Schéma d'un chromatogramme en BA10 d'un extrait naturel de post-abdomen de scorpions (voir texte). E₁: révélation vert de bromocrésol (les zones hachurées sont bleues) et au réactif de SAKAGUCHI (zones pointillées roses). E₂: révélation au rouge de crésol (r = rouge). T: témoins, arg = arginine, agm = agmatine.

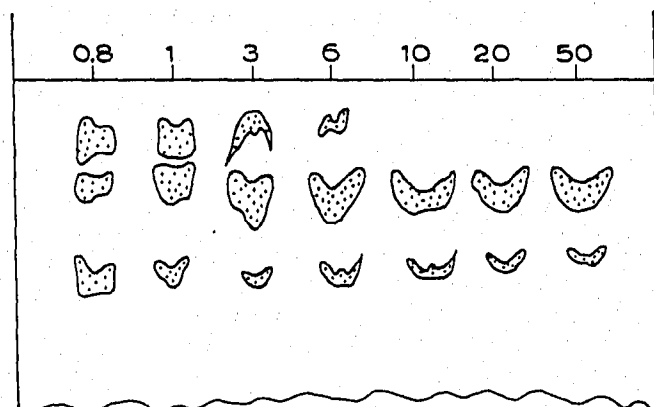


Fig. 2. Schéma d'un chromatogramme en BA10 de 5 µg d'agmatine supplémentés avec des quantités croissantes de NaCl (0,8, 1, 3, 6, 10, 20 et 50 µéquiv.). Papier Whatman 4 lavé, temps de migration: 20 h. Révélation: réactif de SAKAGUCHI.

La plus caractéristique est une tache en V (SAKAGUCHI +, $R_F = 0.20$) ne correspondant à aucun des dérivés guanidiques connus. L'électrophorèse sur papier (tampon véronal de pH = 8.6) ou la chromatographie en Pyridine ne distinguent, cependant, en rien ce produit de l'agmatine témoin. Inversement, de l'agmatine additionnée à l'extrait se comporte comme la tache inconnue. Les révélations aux indicateurs de pH montrent la présence d'un spot basique épousant exactement à sa partie inférieure la forme du spot d'agmatine et, réciproquement, l'addition de soude à une solution d'agmatine donne les mêmes images en butanol-acétique. Les sels neutres (chlorures et sulfates alcalins) produisent eux aussi des troubles évidents dans la migration des

guanidiques. Ainsi la chromatographie d'agmatine en présence de quantités croissantes de NaCl révèle la présence de 2 et 3 spots d'agmatine (Fig. 2). Les indicateurs de pH montrent qu'il y a apparition de plages acides, alcalines ou neutres tout au long du chromatogramme. Les Figs. 3, 4 et 5 montrent des chromatographies de sels neutres et basiques mettant en évidence ces discontinuités de pH en cours de migration. La

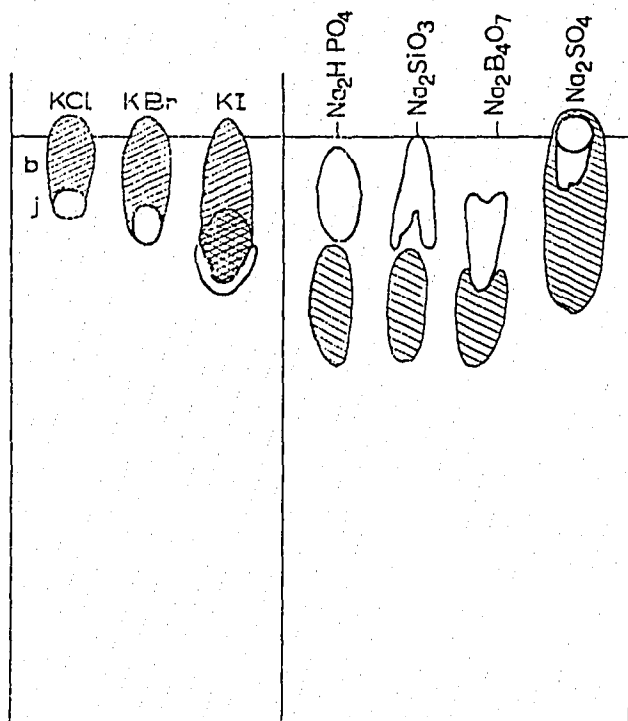


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 3. Schéma d'un chromatogramme en BA10 de KCl, KBr et KI (10 μ l d'une solution saturée). Papier Whatman 1, temps de migration: 14 h. Révélation au vert de bromocrésol. Les zones hachurées sont bleues (b), les incolores jaunes (j).

Fig. 4. Même expérience avec Na_2HPO_4 , Na_2SiO_3 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ et Na_2SO_4 (10 μ l d'une solution saturée).

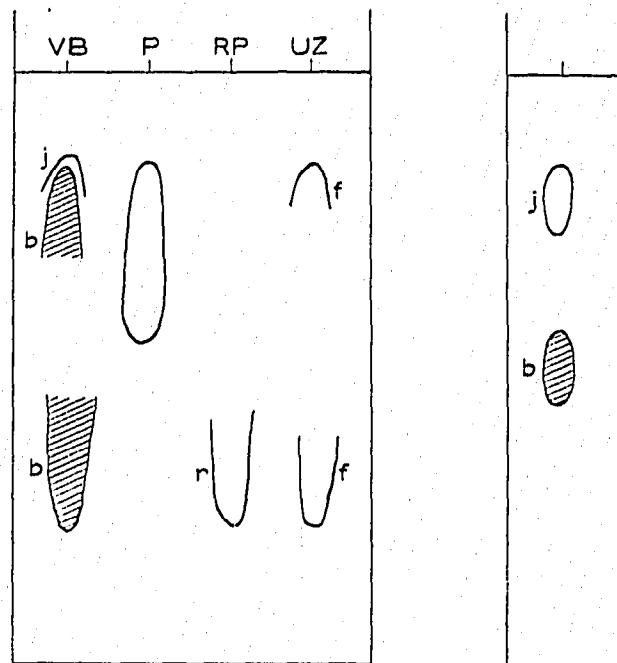


Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 5. Schéma d'un chromatogramme en BA10 de Na_2HPO_4 (1 μ équiv.). Révélation au vert de bromocrésol (VB), à l'acide molybdique (P), au rouge de phénol (RP) et à l'acétate d'uranyle et de zinc (UZ). j = jaune; b = bleu; r = rouge; f = fluorescence jaune-verte en lumière U.V.

Fig. 6. Schéma d'un chromatogramme en BA10 de chlorhydrate de méthylguanidine (5 μ g). Mêmes conditions expérimentales que pour la Fig. 3. La tache b est bleue au VB et rose au réactif de SAKAGUCHI (acétate de méthylguanidine); la tache j, jaune au VB (HCl).

Fig. 6 montre qu'un sel organique (chlorhydrate de méthylguanidine) est capable de donner une décomposition encore plus nette.

Le désir de réaliser des perturbations importantes en faisant migrer des composés ionisés sur une grande longueur de papier nous a incité à utiliser la migration dans l'eau; on peut ainsi obtenir une séparation rapide et correcte de quelques dérivés guanidiques (Fig. 7). De même, on observe dans l'eau une décomposition spectaculaire de sels minéraux, source de perturbations pour la caractérisation de composés orga-

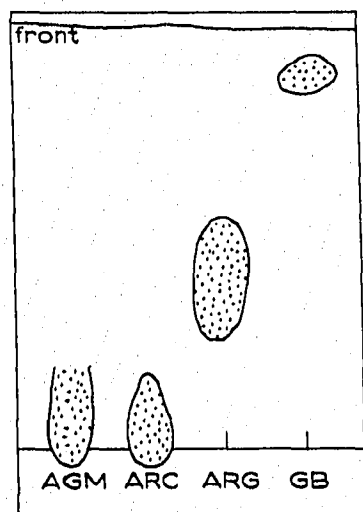


Fig. 7. Schéma d'un chromatogramme (ascendant) dans l'eau bidistillée d'agmatine (agm), arcaïne (arc), arginine (arg) et acide guanidobutyrique (GB), 10 μ g. Papier Whatman 20 non lavé. Révélation au réactif de SAKAGUCHI.

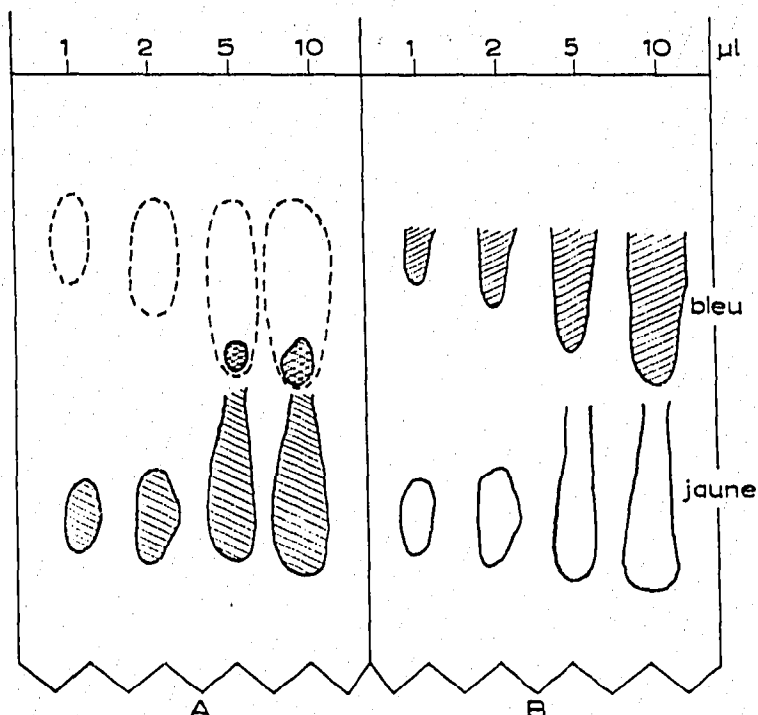


Fig. 8. Schéma d'un chromatogramme (descendant) en BA5 d'une solution de $^{22}\text{NaCl}$ neutre (0.044 μ equiv/ μ l). Papier Whatman 4 lavé. Migration: 4 jours. A: révélation au nitrate d'argent 0.1 N. Les pointillés correspondent aux zones impressionnées en autoradiographie. B: révélation au vert de bromocrésol. Les chiffres indiquent le nombre de microlitres déposés.

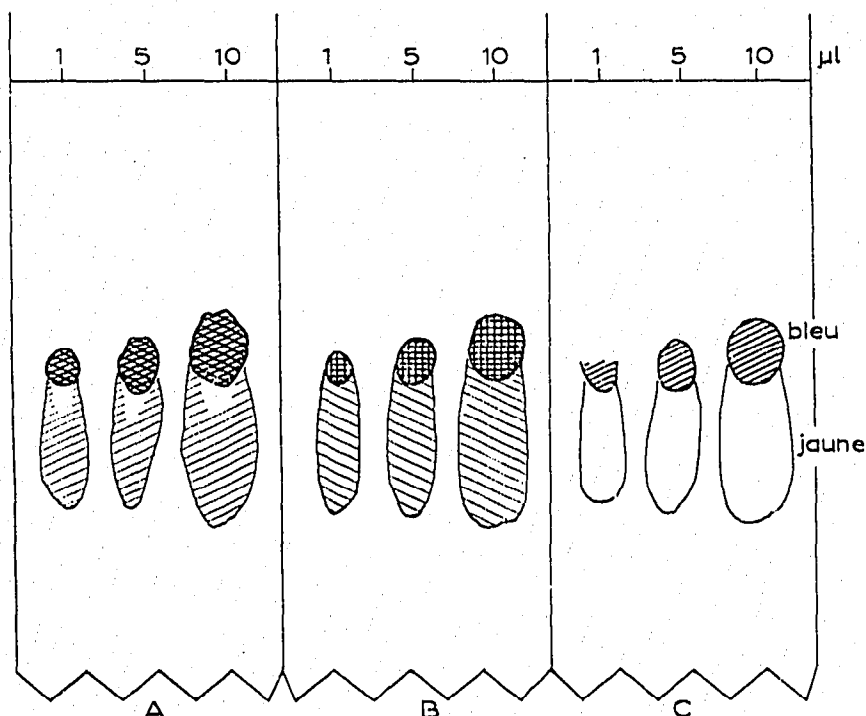


Fig. 9. Même expérience que pour Fig. 8 mais avec Na^{36}Cl (solution neutre à 0.36 μ equiv./ μ l). A: autoradiogramme. B: révélation au nitrate d'argent. C: révélation au vert de bromocrésol.

niques dans un milieu complexe. Cette décomposition a été objectivée en utilisant NaCl doublement marqué par ^{22}Na et ^{36}Cl , le recours à l'emploi de traceurs ayant été initialement pratiqué par LEDERER⁹ et STRAIN ET MURPHY¹⁰. Les Figs. 8, 9, et 10

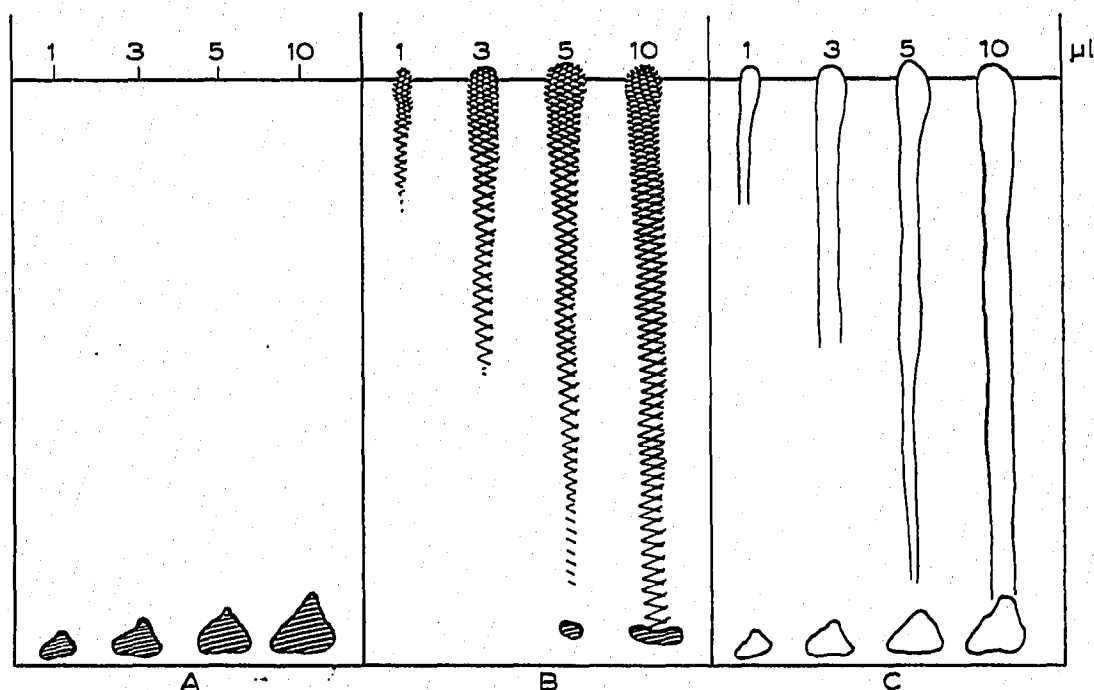


Fig. 10. Schéma d'un chromatogramme (descendant) en eau bidistillée; papier Whatman 4 lavé; migration: 2 h. A: d'une solution Na^{36}Cl ($0.36 \mu\text{equiv./}\mu\text{l}$). Révélation par autoradiographie. B: d'une solution $^{22}\text{NaCl}$ ($0.044 \mu\text{equiv./}\mu\text{l}$). Révélation par autoradiographie. Trainée correspondant au Na^+ échangé par le papier. Les taches en front pour les essais 5 et $10 \mu\text{l}$ correspondent au NaCl non dissocié. C: d'une solution de Na^{36}Cl ; révélation au vert de bromocrésol, AgNO_3 et hélianthine, la tache en front étant respectivement jaune, gris-noire et rose avec ces réactifs.

montrent l'importance de la dissociation obtenue pour cet électrolyte, ce qui permet d'expliquer que la séparation dans l'eau des dérivés guanidiques soit complètement bouleversée par la présence de sels neutres comme NaCl ou Na_2SO_4 (Fig. 11).

DISCUSSION

Les anomalies observées dans ces expériences peuvent toutes s'expliquer par des phénomènes ioniques modifiant le partage, l'intérêt des composés guanidiques étant de constituer de véritables indicateurs de chromatographie parce que très sensibles à ces perturbations. L'agmatine en particulier (base en C_6 non amphotère) passera facilement de l'état ionisé à celui de base non dissociée pour une faible augmentation de la concentration en ions OH^- , ce changement d'état impliquant des différences considérables du coefficient de partage; la forme non ionisée étant beaucoup plus organophile. Ceci est d'autant plus important sur le plan pratique que la purification sur résines échangeuses d'ions d'extraits naturels contenant des bases organiques relativement fortes du type de l'agmatine est à peu près impossible à obtenir à cause

du pK élevé de ces bases en comparaison de celui de bases volatiles comme NH_4OH servant d'éluant.

Les perturbations ioniques en chromatographie peuvent avoir comme origine: le papier, le solvant ou les électrolytes présents dans la solution soumise à la chromatographie. L'interprétation de nos résultats peut être réalisée en fonction de ces trois facteurs.

En tant qu'échangeur d'ions^{3,11,12}, le papier peut jouer un rôle direct en participant à la séparation des composés, ce qui paraît permettre d'interpréter au moins

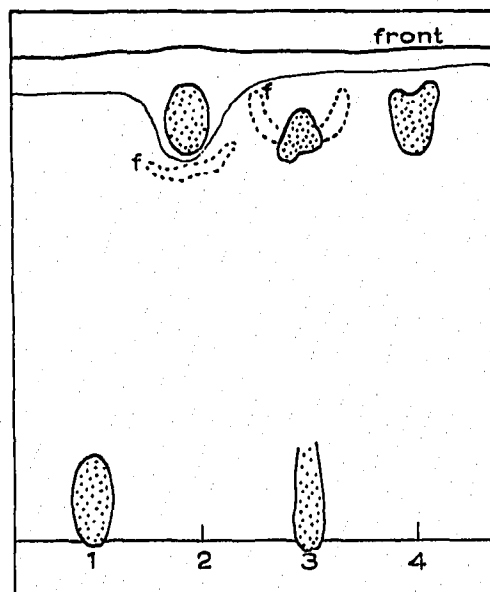


Fig. 11. Schéma d'un chromatogramme dans l'eau bidistillée (temps de migration: 2 h, ascendant) de 5 μg d'agmatine (1), supplémentés de 10 μ équiv. de Na_2SO_4 (2), 10 μ équiv. de NaCl (3) et 20 μ équiv. de NaCl (4). Révélation: réactif de SAKAGUCHI. f = zone fluorescente blanc-bleuâtre en lumière U.V. due aux sels.

partiellement les séparations obtenues dans l'eau pure (Fig. 7) bien que certaines observations^{13,14} ne puissent l'être de cette manière.

Le solvant organique constituant la phase mobile est souvent chargé de composés ionisables (acides ou basiques) et leur présence, en excès par rapport aux substances à chromatographier, conditionne la séparation de ces dernières sous forme de sel de l'acide ou de la base contenu dans le solvant. Dans cet ordre d'idées, WESTALL¹⁵ et CONSDEN ET GORDON¹⁶ appliquant la loi d'action des masses au cas du phénol saturé d'eau et du butanol acétique, expliquent les décompositions salines survenues dans ces solvants.

En ce qui concerne les électrolytes, on a envisagé des interactions de type ionique ou autre entre les substances soumises à la chromatographie, par exemple entre acides aminés¹⁷ (voire entre sucres¹⁸), mais ces phénomènes restent mal expliqués. Par contre, un type d'interactions facile à concevoir est celui de la chromatographie d'extraits naturels où l'on est amené à utiliser des solutions riches en sels. S'ils ont une dissociation basique, cas de notre extrait, leur présence explique la forme en V du spot d'agmatine (Fig. 1), base non amphotère passant en milieu alcalin sous forme

non ionisée dont la solubilité pour le butanol est beaucoup plus grande: de ce fait, l'agmatine ne pourra se déposer qu'à la limite du spot alcalin dû aux sels, là où elle pourra reprendre sa forme d'ion agmatinium beaucoup plus soluble dans l'eau*. Les sels neutres peuvent modifier la chromatographie en rendant le produit analysé moins soluble dans la phase aqueuse (relargage) ou par démixion du solvant à leur niveau²⁰. A côté de ces effets, l'influence des carboxyles du papier paraît devoir jouer un rôle non négligeable par fixation du cation du sel (Figs. 8 à 10). Les conséquences de ces dissociations sont illustrées par les Figs. 2 et 11. Sur cette dernière, on voit le déplacement spectaculaire dans l'eau de l'agmatine, qui, normalement collée au départ, migre pratiquement en front en présence de NaCl ou Na₂SO₄. Ce déplacement peut être expliqué par son décrochage du papier par le sodium qui s'échangerait préférentiellement et aussi parce qu'elle serait solubilisée dans l'eau par HCl provenant de la dissociation du sel.

La Fig. 2 montre des images plus complexes données par la chromatographie de l'agmatine en butanol-acide acétique en présence de quantités croissantes de NaCl. En partant du front, on trouve un spot en forme de V, de surface à peu près constante, correspondant au déplacement de l'agmatine par l'action alcalinisante de l'acétate de sodium formé par hydrolyse de NaCl et dont la quantité est sensiblement proportionnelle à la surface de papier parcourue; un autre spot en V, mais plus important, dont la superficie croît avec la concentration en NaCl, sa forme pouvant s'expliquer par un effet de relargage du sel vis-à-vis de l'agmatine; enfin, un spot en V renversé qui va s'amenuisant pour disparaître à partir d'une certaine concentration en NaCl et dont l'existence s'explique facilement si l'on admet que, lors du dépôt, on a réalisé une chromatographie circulaire ayant eu pour effet de déposer l'agmatine à la périphérie de l'élément perturbateur (NaCl). L'importance des perturbations est conditionnée par la nature des sels et leur concentration. Cette dernière constitue un facteur prépondérant puisque la dimension d'un spot dépend de la quantité de produit présente au départ: en conséquence, le R_F d'une substance venant se déposer à la limite du spot des sels dépend directement de la concentration de ceux-ci. Si, par exemple, dans l'extrait naturel que nous avons utilisé, l'agmatine a un R_F de 0.20, elle aurait un R_F différent dans un autre extrait où la concentration en sels n'aurait pas été la même. Nous avons pu ainsi faire varier le R_F de l'agmatine de 0 à 0.50 dans des expériences réalisées avec différents sels à différentes concentrations.

CONCLUSION

Le caractère de base non amphotère de l'agmatine, composé réagissant d'une manière sensible aux variations de pH (alors que les amphotères peuvent s'adapter assez

* La formation en milieu alcalin, d'agmatine base non dissociée fournit l'explication théorique de l'utilisation des papiers imprégnés de NaOH 0.2 N employés pour la séparation des bases guanidiques¹⁹. Cette méthode permet de séparer les bases non amphotères (agmatine, arcaïne) transformées en composés non dissociés, de R_F quintuplé, des dérivés amphotères dont le R_F est beaucoup moins modifié: doublé pour l'arginine et même diminué pour la glycoeyamine dont le pK_1 est le plus bas.

facilement à ces perturbations) a permis de mettre l'accent sur l'allure hétérogène de la chromatographie d'un extrait naturel riche en sels, en utilisant ce composé comme un véritable indicateur. Travaillant dans une direction opposée par rapport à des auteurs comme MUNIER²⁰ et MACFARREN²¹ qui ont cherché à éviter les phénomènes de déséquilibre pour améliorer la séparation de composés organiques, nous avons voulu mettre à profit des conditions défavorables imposées par l'expérience pour essayer de préciser certains mécanismes impliqués dans la chromatographie sur papier.

RÉSUMÉ

Voulant réaliser la séparation de dérivés guanidiques mono-substitués présents dans des extraits naturels et utilisant pour la révélation : réactifs spécifiques, réactifs de pH et autoradiographie, nous avons étudié, à l'occasion des perturbations observées, le rôle respectif des différents facteurs susceptibles d'apporter des modifications ioniques au milieu : papier, solvant et électrolytes présents dans la solution soumise à la chromatographie.

SUMMARY

In order to separate the mono-substituted guanidino-derivatives present in natural extracts, an investigation was made of the behaviour of these substances in paper chromatography. Specific reagents, pH indicators and autoradiography were used to identify the spots. The disturbances observed led the authors to study the role of various factors that are likely to produce ionic changes in the medium, namely the paper, the solvent and the electrolytes present in the solution subjected to chromatography.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. J. P. MARTIN, *Ann. Rev. Biochem.*, 19 (1950) 517.
- ² R. J. BOSCOFF, *Chem. & Ind. (London)*, (1952) 472.
- ³ A. J. ULTEE, JR. ET J. HARTEL, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 557.
- ⁴ S. LISSITZKY, I. GARCIA ET J. ROCHE, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 436.
- ⁵ R. E. KAY, D. C. HARRIS ET C. ENTENMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 63 (1950) 14.
- ⁶ S. SAKAGUCHI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 5 (1925) 25, 133 et 144.
- ⁷ F. FEIGL, *Spot Tests, Vol. I. Inorganic Applications*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1954, p. 215.
- ⁸ F. M. POLLARD ET J. F. W. MCOMIE, *Chromatographic Methods of Inorganic Analysis*, Butterworths Sci. Publ., London, 1953.
- ⁹ M. LEDERER, *Thèse*, Paris, 1954.
- ¹⁰ H. H. STRAIN ET G. W. MURPHY, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 50.
- ¹¹ T. SCHÖNFELD ET E. BRODA, *Mikrochimie ver. Mikrochim. Acta*, 36/37 (1951) 537.
- ¹² J. B. SCHUTE, *Nature*, 171 (1953) 839.
- ¹³ F. M. BURSTALL, G. R. DAVIES, R. P. LINSTAD ET R. A. WELLS, *J. Chem. Soc.*, (1950) 516.
- ¹⁴ M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 13 (1955) 350.
- ¹⁵ R. G. WESTALL, *Biochem. J.*, 42 (1948) 249.
- ¹⁶ R. CONSDEN ET A. H. GORDON, *Nature*, 162 (1948) 180.
- ¹⁷ M. T. BECK ET P. ÉBREY, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 393.
- ¹⁸ K. MACEK ET M. TADRA, *Chem. listy*, 46 (1952) 450.
- ¹⁹ Y. ROBIN, *Répartition et Métabolisme des guanidines monosubstituées d'origine animale*, Thèse, Paris, 1954.
- ²⁰ R. MUNIER, *Bull. soc. chim. France*, (1952) 852.
- ²¹ E. F. MACFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.