

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE CELLULOSE À LA SÉPARATION DES PTÉRINES NATURELLES

HENRI DESCIMON ET MONIQUE BARIAL

*École Normale Supérieure, Laboratoire de Zoologie et de Biochimie Animale,
24 Rue Lhomond, Paris 5ème (France)*

(Reçu le 1 avril 1966)

La chromatographie sur papier a été à l'origine d'importantes découvertes dans le domaine de la biochimie des ptérines et du contrôle génétique de la biosynthèse de ces substances^{1,2}. Or la chromatographie sur couche mince donne des résultats supérieurs dans l'étude d'autres corps et il était intéressant de l'appliquer aux ptérines. NICOLAUS³ a déjà obtenu de bons résultats avec des couches de gel de silice; cependant nous avons observé avec cet adsorbant une décomposition rapide des substances les plus labiles⁴. Nous nous sommes donc limités à la cellulose qui a permis l'isolement sur colonne de ptérines extrêmement fragiles¹. Les feuilles "Eastman chromagram" ont par ailleurs été essayées sans succès, car les ptérines ne sont pas fluorescentes sur ce support, quel que soit l'adsorbant.

Deux matériels biologiques ont été choisis comme représentant assez typiquement les divers problèmes de la chromatographie des ptérines naturelles: les pigments des yeux de *Drosophila melanogaster*, désormais bien connus² et ceux des ailes de *Colias croceus*⁵. Chez la première se trouvent essentiellement la 2-amino-4-hydroxy-ptéridine (ptérine), l'isoxanthoptérine, la bioptérine, la sépiaptérine, l'isosépiaptérine et trois drosoptérines. De la riboflavine est également observable. Les six dernières ptérines sont fort labiles; la bioptérine et la ptérine d'une part, les trois drosoptérines d'autre part sont difficiles à séparer sur papier. Chez *Colias croceus*, six ptérines ont pu être identifiées: la ptérine, l'isoxanthoptérine, la xanthoptérine, la leucoptérine, l'érythroptérine et la sépiaptérine. L'obstacle réside ici dans la faible solubilité de certaines d'entre elles qui "traînent" fréquemment, dans la séparation difficile de l'érythroptérine et de la leucoptérine d'une part, de l'isoxanthoptérine et de la xanthoptérine d'autre part. Les solvants contenant de l'ammoniaque libre sont à proscrire, car ils altèrent l'érythroptérine en lépidoptérine.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les couches minces ont été préparées avec de la cellulose Macherey-Nagel MN 300 HR (cellulose extra-pure) en délayant 15 g de poudre dans 90 ml d'eau bidistillée, pour 5 plaques 200 × 200 mm et 2 plaques 50 × 200 mm. Cette proportion donne des couches d'une épaisseur d'environ 0.25 mm. Le mélange ainsi obtenu est homogénéisé à l'aide d'un mixer à une vitesse de 20,000 tours/min. La pâte est déposée sur les plaques au moyen d'un étaleur Desaga puis séchée horizontalement à l'étuve à 105° pendant 1 h. Pour être comparés aux couches minces, les papiers Whatman

No. 1 et Whatman No. 20 (200 × 200) sont lavés une heure à l'eau bidistillée et séchés une heure à l'étuve à 105°.

Des substances de référence ont été aimablement fournies par Monsieur le Professeur VISCONTINI ou ont été procurées par des firmes spécialisées.

Les extraits sont préparés pour la *Drosophila* à partir de la souche "vestigiale" et pour le *Colias* à partir des ailes. Dix *Drosophiles* sont broyées dans 0.2 ml de méthanol-pyridine-eau (4:1:5) et 25 mm² d'aile de *Colias* dans 0.25 ml du même solvant. Un volume donné de ces solutions est déposé sur les plaques et les feuilles, à l'aide d'une microsiringue, en une tache de départ située à 28 mm du bas. Les spots ont un diamètre de 5 mm environ. Les cuves utilisées (Desaga) sont étanches: il n'est pas effectué d'équilibrage, les cuves sont saturées par les vapeurs des solvants versés quelques heures à l'avance. La hauteur du liquide est à peu près de 15 mm, le parcours du front de 100 mm, aussi bien pour les plaques que pour les papiers. Le développement est réalisé dans l'obscurité. Les taches sont détectées par observation de leur fluorescence à l'aide d'une lampe Camag émettant à 254 ou 365 nm.

RÉSULTATS

Limites quantitatives de la méthode

Une série de chromatogrammes unidimensionnels a été effectuée avec de la xanthoptérine de synthèse dans le chlorure d'ammonium à 3%. Des quantités croissantes de 0.5 à 100 µg ont été déposées, à des intervalles de 15 mm, sur couche mince et papier Whatman No. 1 et 20. Des photographies de ces chromatogrammes sont reproduites Fig. 1. Elles montrent que la limite inférieure de la tache varie linéairement en fonction de la quantité déposée, c'est-à-dire que la traînée augmente (Fig. 2). La comparaison des papiers et de la couche mince est en faveur de celle-ci (traînée plus courte).

D'autre part il était intéressant de déterminer la variation de la surface de la tache en fonction de cette même quantité de substance (Fig. 3). Sur la couche mince cette surface est toujours inférieure à celle observée sur papier, elle augmente plus régulièrement et la saturation, qui se traduit par l'apparition d'un plateau, se produit également un peu plus tard. La surface plus faible du spot permet une détection de quantités plus petites, variables d'ailleurs avec le solvant, mais en général inférieures à 0.1 µg.

Des faits similaires peuvent être observés avec des aliquots d'extraits bruts de *Drosophila* mais les chevauchements éventuels rendent la détection dépendante de la qualité des séparations. Un quart de *Drosophila* donne des taches déjà bien discernables et de bons résultats sont obtenus avec un individu; au-dessus la lecture est confuse en une seule dimension.

Valeurs comparées des R_F dans différents solvants

Le support étant le même, la cellulose, il semble que la nature des séparations ne doit pas différer sur couche mince et sur papier. En vue de vérifier cette hypothèse nous avons mesuré les R_F à solvants et modes opératoires identiques, dans les deux cas, pour un certain nombre de ptérines naturelles. Les solvants employés sont les suivants, les chiffres entre parenthèses étant les temps de montée respectifs de la couche mince et du papier No. 1:

- (1) Isopropanol-acétate d'ammonium à 2 % (1:1) (1 h 50-2 h 20);
- (2) Chlorure d'ammonium à 3 % (0 h 20-0 h 25);
- (3) Propanol-ammoniaque à 2 % (2:1) (1 h 30-1 h 55);
- (4) *n*-Butanol-acide acétique-eau (20:3:7) (1 h 30-1 h 55);
- (6) *sec*-Butanol-acide formique-eau (8:2:5) (1 h 15-1 h 35);
- (7) *n*-Butanol-pyridine-eau (6:4:3) (2 h 20-2 h 40);
- (8) Acétate d'ammonium à 2 %-pyridine (59:5) (0 h 40-0 h 50);
- (9) Formiate de pyridine 0.1 *N*, pH 6.

Les valeurs de R_F sont rassemblées dans le Tableau I; bien qu'elles soient en général plus élevées sur couche mince, il apparaît que les positions relatives des différentes ptérines dans l'échelle des R_F sont identiques sur les deux matériels et dans un même solvant.

La similitude des séparations chromatographiques est ainsi vérifiée; il n'entre pas dans le cadre de ce travail de les attribuer à des phénomènes d'adsorption ou de partage. Par ailleurs, des modifications importantes ont été observées si on utilise une cellulose avec liant minéral. La grande sensibilité de valeur des R_F à la présence d'impuretés de toutes sortes explique probablement leur reproductibilité assez faible, bien connue en chromatographie sur papier et qui se retrouve sur couche mince. Il est donc indispensable pour les identifications de ne pas utiliser les R_F obtenus directement par la chromatographie d'extraits bruts mais de procéder à une séparation préliminaire puis à une élution. Ensuite seulement les R_F de la substance à identifier seront comparés, sur la même couche et sur un nombre suffisant de spots, à ceux des ptérines de référence. Malgré tout, on observe parfois des différences persistantes dues probablement à l'état chélaté des ptérines naturelles^{6,7}.

Exemples de séparations à l'aide de la chromatographie bidimensionnelle

L'examen du Tableau I montre qu'une seule dimension ne suffit pas à séparer certaines ptérines (les R_F sont trop voisins les uns des autres). Il est donc nécessaire d'utiliser une deuxième dimension complémentaire de la première. Le système de

TABLEAU I

R_F DE QUELQUES PTÉRINES NATURELLES SUR PAPIER WHATMAN NO. 1 (I) ET COUCHE MINCE DE CELLULOSE (CM)

Pour la composition des solvants 1-8, voir texte. Température: 21-23°.

| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 6 | | 8 | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | CM | I | CM | I | CM | I | CM | I | CM | I | CM | I |
| Ptérine | 0.52 | 0.53 | 0.58 | 0.60 | 0.315 | 0.215 | 0.40 | 0.15 | 0.435 | 0.205 | 0.875 | 0.83 |
| Isoxanthoptérine | 0.355 | 0.295 | 0.45 | 0.40 | 0.085 | 0.75 | 0.345 | 0.165 | 0.3 | 0.14 | 0.76 | 0.655 |
| Xanthoptérine | | | | | 0.125 | 0.135 | 0.41 | 0.27 | 0.39 | 0.35 | 0.84 | 0.73 |
| Leucoptérine | 0.135 | 0.085 | 0.365 | 0.24 | 0.05 | 0.085 | 0.13 | 0.065 | 0.185 | 0.185 | 0.59 | 0.5 |
| Bioptérine | 0.6 | 0.635 | 0.745 | | 0.355 | 0.265 | 0.475 | 0.235 | 0.415 | 0.145 | 0.96 | 0.82 |
| Sépiaptérine | 0.52 | 0.475 | 0.355 | 0.385 | 0.30 | 0.25 | 0.49 | 0.235 | 0.465 | 0.2 | 0.765 | 0.665 |
| Isosépiaptérine | 0.55 | | 0.675 | | 0.43 | 0.415 | 0.63 | 0.39 | 0.585 | 0.35 | 0.65 | |
| Erythroptérine | 0.175 | 0.15 | 0.28 | 0.24 | 0.05 | 0.045 | 0.12 | 0.045 | 0.30 | 0.245 | 0.68 | 0.60 |
| Néodrosoptérine | 0.05 | 0.035 | 0.075 | 0.05 | 0.05 | 0.02 | 0.105 | 0.04 | 0.10 | 0.005 | 0.205 | 0.21 |
| Drosoptérine | 0.16 | 0.10 | 0.25 | 0.21 | | | | | | | 0.495 | 0.45 |
| Isodrosoptérine | 0.12 | 0.155 | 0.39 | 0.30 | | | | | | | 0.51 | 0.48 |

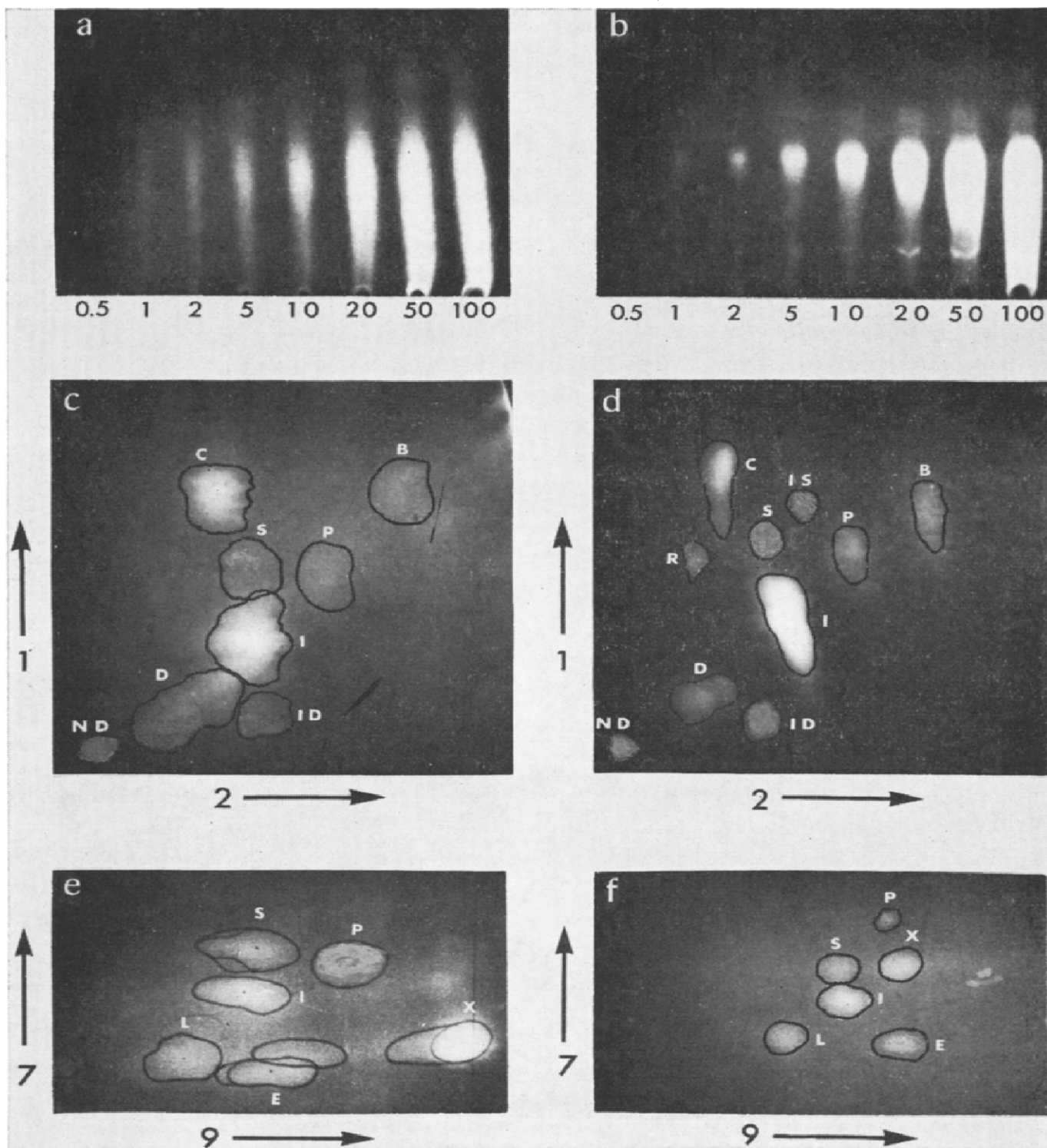


Fig. 1. (a) Chromatogramme sur papier Whatman No. 1 de quantités croissantes de xanthoptérine (en μg). Solvant: NH_4Cl 3%. (b) Chromatogramme sur couche mince de cellulose. Solvant: le même que sous (a). (c) Chromatogramme bidimensionnel sur papier Whatman No. 1 de l'aliquot de deux *Drosophiles*. Solvants: 1 = isopropanol-acétate d'ammonium 2% (1:1); 2 = NH_4Cl 3%. (d) Chromatogramme bidimensionnel sur couche mince de cellulose. Solvants: les mêmes que sous (c). (e) Chromatogramme bidimensionnel sur papier Whatman No. 1 de l'aliquot de 5 mm² d'aile de *Colias croceus*. Solvants: 7 = *n*-butanol-pyridine-eau (6:4:3); 9 = formiate de pyridine, pH 6, 0,1 N. (f) Chromatogramme bidimensionnel sur couche mince de cellulose, aliquot de 2 mm². Solvants: les mêmes que sous (e). B = Biotérine; C = cynurénine; D = drosoptérine; E = érythroptérine; I = isoxanthoptérine; ID = isodrosoptérine; IS = isosépiaptérine; L = leucoptérine; ND = néodrosoptérine; P = ptérine; R = riboflavine; S = sépiaptérine; X = xanthoptérine.

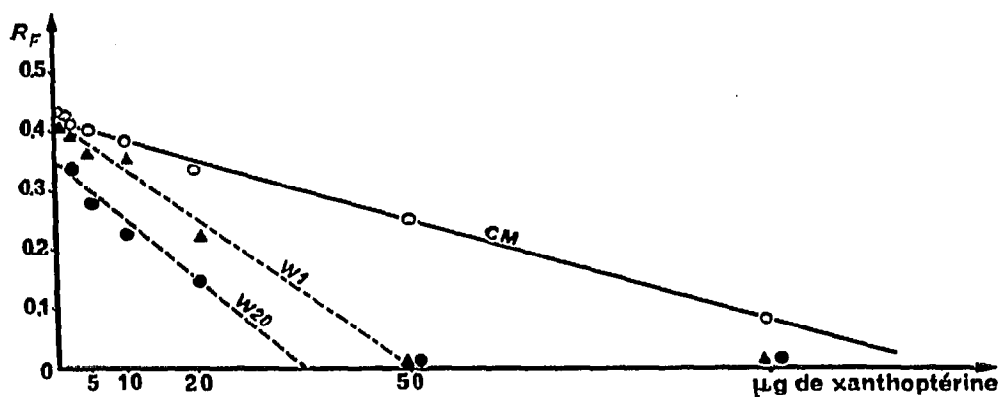


Fig. 2. Limite postérieure des taches de quantités croissantes de xanthoptérine chromatographiées sur papier Whatman No. 1 (W1), Whatman No. 20 (W20) et sur couche mince de cellulose (CM). Solvant: NH_4Cl 3 %.

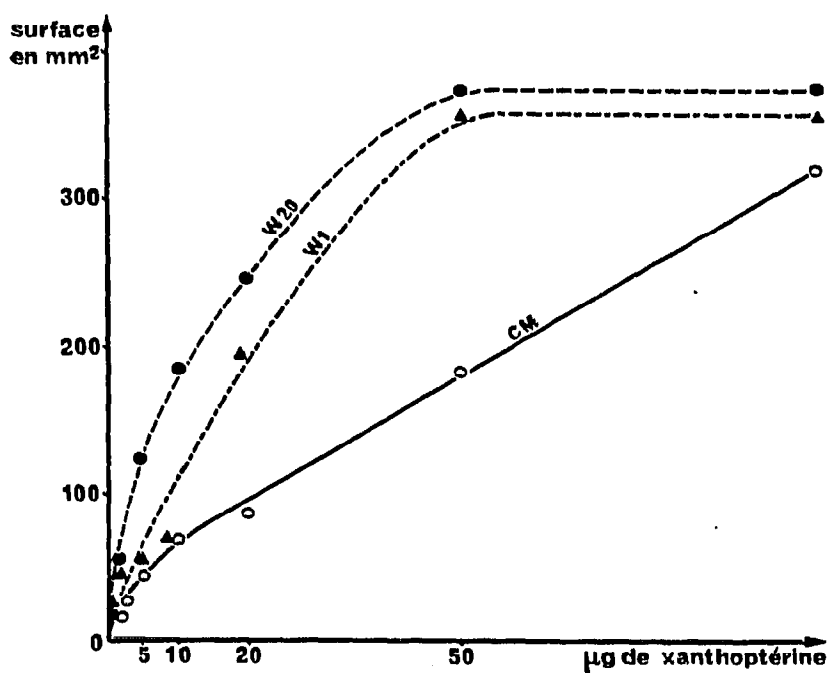


Fig. 3. Surface des taches de quantités croissantes de xanthoptérine chromatographiées sur papier Whatman No. 1 (W1), Whatman No. 20 (W20) et sur couche mince de cellulose (CM). Solvant: NH_4Cl 3 %.

solvants employé est 1 puis 2 et les spots représentent l'aliquot de deux *Drosophiles*. Deux chromatogrammes ont été photographiés et reproduits (Fig. 1). Il semble que la couche mince ait tendance à traîner davantage en première dimension; cependant les séparations sont meilleures. Pour une même quantité toutes les ptérines sont visibles et bien séparées sur couche mince alors que certaines sont indécélables sur papier.

Chez *Colias croceus*, l'essai de très nombreux systèmes nous a conduits à choisir le solvant 7 en première dimension et le solvant 9 en seconde. Cette combinaison donne des résultats satisfaisants sur papier, malgré la grande surface des taches obtenues; il est possible de séparer des quantités de plusieurs μg de ptérines; celles qui sont les plus abondantes traînent quelque peu, mais celles qui sont présentes en faible quantité sont bien décelables. Sur couche mince, des quantités de deux à cinq fois plus faibles (de l'ordre du μg) donnent des résultats très clairs, avec des taches petites et ramassées, mais les ptérines peu abondantes apparaissent à peine et il n'est pas possible de les doser fluorimétriquement. Avec des quantités identiques à celles traitées sur papier, des traînées apparaissent brusquement et rendent le chromatogramme illisible. Ce phénomène semble dû ici à la mauvaise solubilité des ptérines présentes, aggravée par la montée plus rapide du solvant et la plus faible surface des taches, qui est liée à une mise en solution dans un volume plus faible. Seul le choix de solvants très alcalins⁸ permettrait d'améliorer ces résultats, mais l'altérabilité des ptérines naturelles est grande dans ces conditions.

La couche mince de cellulose a également donné d'excellents résultats dans l'analyse des ptérines des Hémiptères⁹.

CONCLUSION

Les résultats obtenus sur couche mince de cellulose pure et sur papier ne diffèrent pas fondamentalement: les positions relatives des diverses ptérines sur les chromatogrammes sont sensiblement identiques. Il est donc facile de passer d'une technique à l'autre.

Le rapport quantité de substance/surface de la tache est nettement en faveur de la couche mince. La limite inférieure de détection s'en trouve abaissée et la séparation de deux ptérines, à différence de R_F identiques, améliorée. Les quantités maximales tolérées sont similaires et parfois meilleures sur couche mince pour les ptérines bien solubles.

Les solutions aqueuses donnant des traînées gênantes sur papier sont beaucoup plus utilisables sur couche mince. L'amélioration est moins nette pour les solvants organiques, voire même inexistante.

La chromatographie bidimensionnelle, indispensable pour réussir les séparations de mélanges complexes, est facile à mettre en oeuvre.

La chromatographie sur couche mince de cellulose apporte donc des améliorations sensibles dans l'analyse des ptérines, mais elle est loin d'en résoudre tous les problèmes, particulièrement dans le cas des traînées dues à une mauvaise solubilité. Cette technique peut donc rendre des services dans les analyses les plus fines, mais le papier convient encore parfaitement pour les travaux en série et de routine.

RÉSUMÉ

La chromatographie uni- et bidimensionnelle sur couche mince de cellulose a été appliquée à la séparation des ptérines de *Drosophila melanogaster* et du papillon *Colias croceus*. Elle est plus sensible et donne des résultats plus lisibles que la chromatographie sur papier. La répartition des taches est à peu près la même que sur papier avec des solvants identiques. Cependant, les ptérines peu solubles donnent des traînées gênantes.

SUMMARY

One- and two-dimensional cellulose thin-layer chromatography has been applied to the separation of the pteridines of *Drosophila melanogaster* and of the butterfly *Colias croceus*. This method is more sensitive and gives more clearcut results than paper chromatography. The spot-patterns are nearly the same as on paper with identical solvents. However, difficultly soluble pteridines cause troublesome tailing.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 I. ZIEGLER-GUNDER, *Advan. Genet.*, 10 (1961) 349.
- 2 M. VISCONTINI, *Farmaco (Pavia), Ed. Sci.*, 18 (1963) 47.
- 3 B. J. R. NICOLAUS, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 384.
- 4 H. DESCIMON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 4637.
- 5 H. DESCIMON, *Compt. Rend.*, 260 (1965) 4637.
- 6 H. S. FORREST, E. W. HANLY ET J. M. LAGOWGSKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 596.
- 7 H. KIKKAWA, Z. OGITA ET S. FOJITO, *Science*, 121 (1955) 43.
- 8 H. KWIETNY ET F. BERGMANN, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 162.
- 9 L. MERLINI AND G. NASINI, *J. Insect. Physiol.*, 12 (1966) 123.

J. Chromatog., 25 (1966) 391-397