

CHROM. 3424

## FRACTIONNEMENT DES POLYPHOSPHATES INORGANIQUES DE LONGUE CHAÎNE SUR SEPHADEX G100\*

S. FELTER, G. DIRHEIMER ET J. P. EBEL

*Laboratoires de Chimie Biologique des Facultés de Sciences et de Pharmacie, Strasbourg (France)*

(Reçu le 15 décembre 1967)

## SUMMARY

*Fractionation of inorganic long-chain polyphosphates on Sephadex G100*

A technique for the fractionation of inorganic long-chain polyphosphates by exclusion diffusion on Sephadex G100 has been worked out. This technique allows the fractionation of polyphosphate chains from 10 to 40 phosphate residues, as shown by the potentiometric determination of the chain length of the different polyphosphates after elution. A linear relation was found between the elution volume and the logarithm of the chain length.

## INTRODUCTION

Les techniques permettant de séparer les polyphosphates de courte chaîne (2-14 résidus de phosphate) sont bien au point: ce sont des méthodes de chromatographie sur papier, sur plaque ou sur colonne. (Pour une revue générale de ces techniques, voir HETTLER<sup>1</sup> ET EBEL<sup>2,3</sup>). Mais il n'existe que peu de techniques qui conduisent à un fractionnement des polyphosphates de longue chaîne. Une méthode de séparation par des solvants organiques comme l'acétone<sup>4,5</sup> a été décrite. De plus, une approche de ce problème a été tentée par chromatographie sur papier<sup>6</sup>.

Lors d'une étude de séparation des acides ribonucléiques et des polyphosphates sur Sephadex G200, nous avons observé un étalement des polyphosphates<sup>7</sup>, ce phénomène a été retrouvé en chromatographie sur G100 où les polyphosphates étaient élués dans les fractions comprises entre le volume exclu et le volume inclus dans le gel. Ce phénomène nous a amenés à penser que ce dernier type de chromatographie permettait un fractionnement des polyphosphates de longue chaîne.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel et méthodes**Préparation des polyphosphates inorganiques*

*Polyphosphate de sodium de longueur de chaîne moyenne correspondant au décaphosphate.* Un polyphosphate de sodium de longueur de chaîne moyenne égale à

\* Dédié à M. le Professeur E. LEDERER à l'occasion de son 60ème anniversaire.

10 groupements phosphate a été préparé en portant pendant 4 h à 900°, puis en refroidissant brusquement un mélange de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  et de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tel que le rapport  $\text{Na}_2\text{O}/\text{P}_2\text{O}_5$  corresponde à la formule  $\text{Na}_{12}\text{P}_{10}\text{O}_{31}$  (2 moles de phosphate disodique pour 8 moles de phosphate monosodique).

*Sel de Graham.* Un échantillon de sel de Graham a été préparé par fusion de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à 800° pendant 18 h, suivie d'un refroidissement brusque. Le produit obtenu a été dissous dans l'eau, dialysé pendant 24 h à froid pour éliminer les polyphosphates de courte chaîne, puis lyophilisé. La longueur de chaîne moyenne de l'échantillon, déterminée par titration potentiométrique, était de 20 groupements phosphate.

*Sel de Kurrol sodique (polyphosphate de sodium hautement polymérisé).* Il a été préparé en amenant en 4 h du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 775° par élévation graduelle de la température; après refroidissement brusque, le produit insoluble a été mis en solution par échange du potassium contre du sodium sur Dowex 50 selon la technique de PFANSTIEL ET ILLER<sup>8</sup>.

#### *Technique chromatographique utilisée*

Le Sephadex Groo a été mis en suspension et agité dans une solution aqueuse de  $\text{NaCl}$  0.05 M. Après sédimentation, les particules les plus légères ont été éliminées. La suspension résiduelle a été introduite dans une colonne de chromatographie de 3.2 cm de diamètre. Le lit de Sephadex avait une hauteur de 150 cm. Le gel a été équilibré à 4° contre une solution de  $\text{NaCl}$  0.05 M. Une solution renfermant un mélange des différents polyphosphates a été déposée au sommet de la colonne et l'élution a été effectuée à 4° par  $\text{NaCl}$  0.05 M, le débit étant de 5-10 ml/h. Les fractions recueillies étaient de 25 ml.

#### *Analyse des fractions*

Le phosphate des polyphosphates a été évalué sur une partie aliquote de chaque fraction après hydrolyse acide, puis dosage du phosphate selon la technique colorimétrique de BRIGGS<sup>9</sup>.

La longueur de chaîne moyenne des polyphosphates a été déterminée par la mesure du rapport des acidités faibles terminales aux acidités fortes des groupements intermédiaires avec un Titrigraph Radiometer, selon la technique de VAN WAZER et coll.<sup>10</sup>.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

En déposant sur la colonne de Sephadex Groo un mélange de 100 mg des trois polyphosphates étudiés (décaphosphate, sel de Graham et sel de Kurrol sodique), on obtient un étalement des polyphosphates sur un volume de 750 à 800 ml comme le montre la Fig. 1.

Une relation linéaire existe entre le volume d'élution et le logarithme de la longueur de chaîne à condition que celle-ci soit comprise entre 10 et 40 groupements phosphate. Au-dessus d'une longueur de chaîne de 40, cette relation n'existe plus, car les polyphosphates sont élués avec le volume mort de la colonne. En effet, un acide ribonucléique ribosomal de levure constitué de 2 fractions: l'une de poids moléculaire de 550 000, l'autre de 1 100 000, toutes deux totalement exclues du gel, est élué dans les fractions 12 à 16. Les polyphosphates élués jusqu'à la fraction 16 sont donc également exclus du gel et ne sont pas fractionnés. La presque totalité du sel de Kurrol rentre donc dans cette catégorie.

La longueur de chaîne des polyphosphates recueillis décroît progressivement lorsqu'on passe des premières fractions éluées aux dernières (Tableau I). La filtration sur Sephadex G100 permet donc une assez bonne séparation des polyphosphates de longue chaîne en fonction de la longueur de chaîne moyenne, à condition que celle-ci soit comprise entre 10 et 40 groupements phosphate. Elle complète donc les techniques classiques qui ne fractionnaient plus les polyphosphates supérieurs à 15 groupements phosphate.

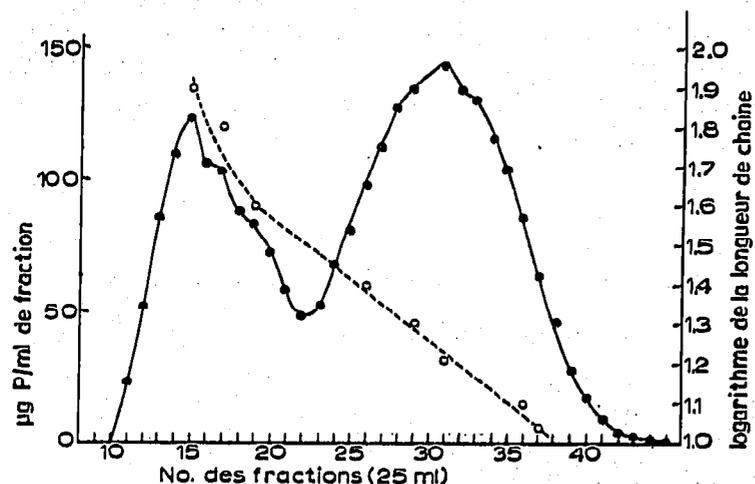


Fig. 1. Chromatographie sur gel de dextrane Sephadex G100 d'un mélange renfermant 100 mg de chacun des polyphosphates suivants: sel de Kurrol, sel de Graham et décaphosphate. (●—●)  $\mu\text{g}$  de P contenus dans 1 ml de fraction; (○---○) logarithme de la longueur de chaîne moyenne des polyphosphates des différentes fractions.

TABLEAU I

VALEURS DES LONGUEURS DE CHAÎNE MOYENNES DES POLYPHOSPHATES DANS LES DIFFÉRENTES FRACTIONS ÉLUÉES DE LA COLONNE DE SEPHADEX G100

No. des fractions (fractions de 25 ml)	17	19	26	29	31	34	37
Longueur de chaîne moyenne du polyphosphate	62	41	26	21	15	13	11
Logarithme de la longueur de chaîne moyenne	1.8	1.6	1.4	1.3	1.2	1.1	1.04

Cette technique permet de connaître dans un mélange complexe de polyphosphates de longue chaîne le pourcentage des différents polyphosphates qui le composent, ce qui n'est pas possible avec la seule détermination de la longueur de chaîne moyenne.

De plus, elle permet, dans le cas de polyphosphates présents en petites quantités ou de polyphosphates radioactifs chez lesquels une détermination de longueur de chaîne moyenne n'est pas possible, de connaître cette dernière. En effet, la position d'éluion des polyphosphates permet de leur attribuer une longueur de chaîne sur une colonne de référence pour laquelle la courbe d'éluion des polyphosphates en fonction de leur longueur de chaîne aura été déterminée au préalable.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme MARIE-LOUISE GANGLOFF pour sa collaboration technique.

## RÉSUMÉ

Une technique de fractionnement des polyphosphates inorganiques de longue chaîne par exclusion diffusion sur Sephadex G100 a été mise au point. Elle permet de fractionner les chaînes entre 10 et 40 groupements phosphoriques ainsi que l'a montré la détermination par titration potentiométrique des longueurs de chaînes des différents polyphosphates élués. Une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la longueur de chaîne a pu être mise en évidence.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. HETTLER, dans M. LEDERER (Rédacteur), *Chromatographic Reviews*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1959, pp. 225-245.
- 2 J. P. EBEL, *Metodi di Separazione nella Chimica organica*, Consiglio Nazionale della Ricerche, Academia naz. Roma, 1962.
- 3 J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. France*, (1968) sous presse.
- 4 J. R. VAN WAZER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 647.
- 5 W. S. MARTENS ET W. M. RIEMAN, *J. Polymer. Sci.*, 54 (1961) 603.
- 6 S. OHASHI ET J. R. VAN WAZER, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1984.
- 7 G. DIRHEIMER ET J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 399.
- 8 R. PFANSTIEL ET R. K. ILER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 6059.
- 9 A. P. BRIGGS, *J. Biol. Chem.*, 53 (1922) 13.
- 10 J. R. VAN WAZER, E. J. GRIFFITH ET J. F. MAC CULLOUGH, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1755.

*J. Chromatog.*, 35 (1968) 207-210