

CHROM. 3600

## RÉSOLUTIONS CHROMATOGRAPHIQUES DE RACÉMIQUES SUR ÉCHANGEURS D'IONS NATURELS, OPTIQUEMENT ACTIFS

## I. RÉOLUTION DE BASES ORGANIQUES SUR L'ACIDE POLYGALACTURONIQUE

CHR. KRATCHANOV ET M. POPOVA

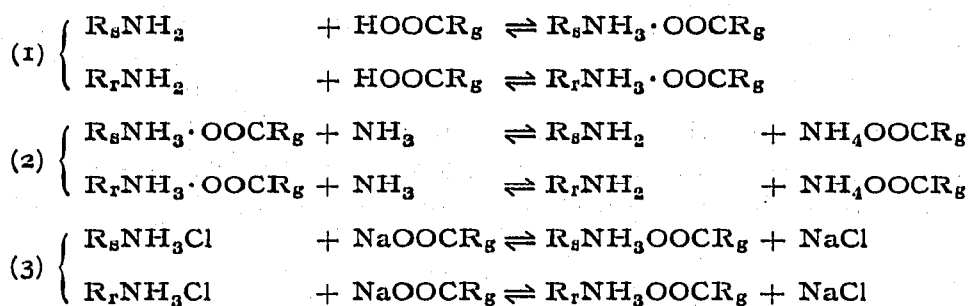
*Département de Chimie Organique et Biochimie, Institut Supérieur de l'Industrie Alimentaire, Boul. Lenin 26, Plovdiv (Bulgarie)*

(Reçu le 10 mai 1968)

## SUMMARY

*Chromatographic resolution of racemates on natural optically active ion-exchangers. I. Resolution of racemic bases on polygalacturonic acid*

It has been shown experimentally that chromatographic resolution of racemic bases on polygalacturonic acid is possible according to any one of the following equations:



It was found that the degree of swelling of the polygalacturonic acid in the system water-methanol-ether strongly affects the effectivity of the resolution. The latter increases as the degree of swelling increases, reaching its highest value at an optimal swelling of 20-25 ml/g.

## INTRODUCTION

Un grand nombre de publications traitent de l'utilisation d'adsorbants naturels, optiquement actifs, pour la séparation chromatographique de racémiques<sup>1-3</sup>. En ce sens, l'amidon<sup>4,5</sup>, la cellulose<sup>6-9</sup>, certaines substances protéiques, et d'autres composés optiquement actifs, le quartz, etc., ont été utilisés avec succès.

En outre, différents échangeurs d'ions optiquement actifs<sup>10,11</sup> ont été synthésés et utilisés au cours des dix dernières années, pour séparer la lysine, l'acide

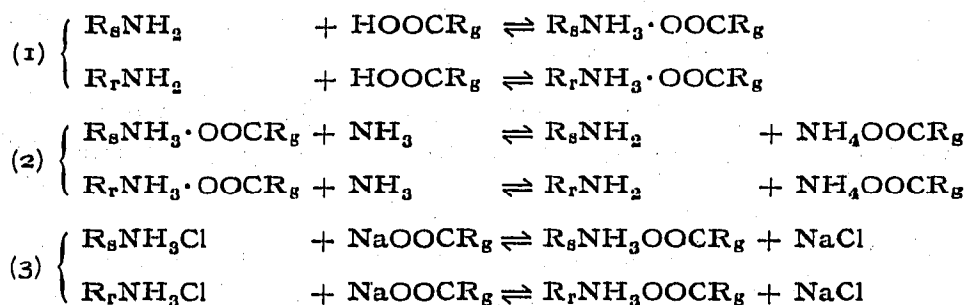
mandélique, et d'autres racémiques — cependant — jusqu'à présent les polyélectrolytes naturels, telles les substances pectiques (et plus spécialement l'acide polygalacturonique) et l'algine, n'ont pas attiré l'attention des chercheurs. Mais les susdits produits étant accessibles et d'homogénéité chimique relativement grande, nous les avons jugés très utiles pour séparer chromatographiquement des bases racémiques.

Jusqu'ici un seul essai<sup>12</sup> a été publié sur ces études, leur auteur ayant utilisé de la chitine déacétylée en guise d'anionite optiquement active.

Dans une communication préliminaire<sup>13</sup>, nous avons posé les conditions qui favoriseraient l'usage d'échangeurs d'ions optiquement actifs pour le dédoublement chromatographique de bases ou d'acides racémiques.

#### RAPPEL THÉORIQUE

En nous basant sur des considérations théoriques d'ordre général nous avons pu admettre que la résolution chromatographique d'une base racémique ( $R_SNH_2 + R_RNH_2$ ) pourrait être réalisée sur les cellules élémentaires ( $R_gCOOH$ ) de l'acide polygalacturonique, selon les réactions suivantes:



En principe, il est possible d'établir des conditions assurant différents comportements des deux antipodes du mélange racémique pour chacune des réactions.

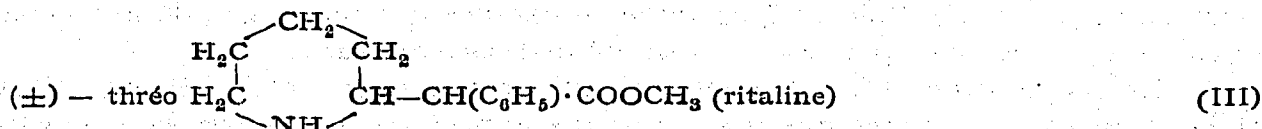
Nous avons expérimentalement confirmé cette hypothèse.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

##### Matériel

Nous avons effectué des chromatogrammes sur colonne, utilisant l'acide polygalacturonique, obtenu de moelles d'*Helianthus* à 96 % de pureté<sup>14</sup>, dont le degré de gonflement dans le système eau-méthanol-éther dépend des rapports de ces trois composants au cours du traitement préalable de l'acide polygalacturonique et se traduit par le volume (en ml) d'un gramme d'acide polygalacturique.

##### Bases utilisées



*Méthodes*

*Essais I-VII (Tableaux II et III).* Dans la colonne remplie d'acide polygalacturonique au juste degré de gonflement nous avons introduit la base sous forme de solution diluée dans du méthanol-éther (1:1). Nous avons recueilli de deux à sept fractions d'éluats; ensuite nous avons fractionné la colonne elle-même en deux à trois fractions que nous avons extraites avec de l'acide chlorhydrique (1% dans du méthanol). Nous avons ensuite neutralisé avec du bicarbonate de sodium solide et fait évaporer le solvant. À fin d'éliminer les traces d'acides polygalacturoniques éventuellement entraînés nous avons traité les résidus avec 20 ml de bicarbonate de sodium (5%). La base a été alors extraite avec de l'éther. Une fois l'éther évaporé, les résidus ont été dissous à chaud dans de l'hexane (10 ml) et filtrés. Après la filtration l'hexane a été évaporé. Les substances basiques sèches obtenues ont été dissoutes dans 5-10 ml de chloroforme et leur activité optique a été mesurée avec un polarimètre "Jouan". Les conditions expérimentales de chacune des chromatographies réalisées sont reportées sur le Tableau I.

TABLEAU I

## CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

|  | Numéro de l'essai |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|  | I                 | II                | III               | IV                | V                 | VI                | VII               |
| Hauteur du remplissage de la colonne (mm)                | 125               | 125               | 120               | 120               | 115               | 110               | 125               |
| Diamètre de la colonne (mm)                              | 14                | 11                | 11                | 14                | 18                | 15                | 19                |
| Poids de l'acide polygalacturonique dans la colonne (g)  | 5.2               | 2.3               | 1.1               | 0.85              | 1.1               | 0.85              | 2.2               |
| Degré de gonflement de l'acide polygalacturonique (ml/g) | 3.5               | 5                 | 10                | 23                | 27                | 23                | 14                |
| Base racémique ajoutée (g)                               | 0.5               | 0.5               | 0.5               | 0.5               | 0.5               | 0.5               | 0.5               |
| au mélange de méthanol-éther, 1:1 (ml)                   | $\frac{0.5}{100}$ | $\frac{0.5}{100}$ | $\frac{0.5}{100}$ | $\frac{0.5}{100}$ | $\frac{0.5}{100}$ | $\frac{0.5}{100}$ | $\frac{0.5}{100}$ |
| Vitesse de l'élution (ml/h)                              | 35                | 35                | 35                | 35                | 35                | 100               | 170               |
| Volume de différentes fractions éluats (ml)              | I                 | 50                | 100               | 100               | 100               | 100               | 200               |
|  | II                | 50                | 420               | 100               | 100               | 90                | 600               |
|  | III               | 50                | —                 | 100               | 80                | 50                | 100               |
|  | IV                | 50                | —                 | 80                | 20                | 50                | 100               |
|  | V                 | 125               | —                 | 90                | 70                | 100               | 100               |
|  | VI                | —                 | —                 | —                 | —                 | —                 | 100               |
|  | VII               | —                 | —                 | —                 | —                 | —                 | 40                |
|  | VIII              | —                 | —                 | —                 | —                 | —                 | —                 |

*Essai VIII (Tableau IV).* Nous avons dissous dans 5 ml d'un mélange de méthanol (85%)—éther (1:1) de la base I, mélangée à 0.5 g d'acide polygalacturonique en poudre. Vingt-quatre heures après le sel obtenu a été introduit dans la colonne chromatographique (diamètre 18 mm) préalablement remplie de 4 g d'acide polygalacturonique au degré de gonflement de 17 ml/g.

Une solution de méthanol-éther (1:1) a été utilisée comme solvant. La colonne était de 290 mm. Nous avons élué avec de l'ammoniaque (0.1%) dilué dans du méthanol-éther (1:1) [45 ml de méthanol (85%), 50 ml d'éther, 5 ml d'eau ammoniacale (2%)]. Vitesse de l'élution: 170 ml/heure. Nous avons recueilli 30 fractions

TABLEAU II

EFFETS DU DEGRÉ DE GONFLEMENT SUR L'EFFICACITÉ DE LA SÉPARATION

| I<br>Degré de gonflement = 3.5 ml/g |                                       |                   | II<br>Degré de gonflement = 5 ml/g |                                       |                   | III<br>Degré de gonflement = 12 ml/g |                                       |                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| No. de la fraction                  | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ | No. de la fraction                 | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ | No. de la fraction                   | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ |
| 1                                   | 0.017                                 | 0                 | 1                                  | 0.004                                 | 0                 | 1                                    | 0.005                                 | +3.2              |
| 2                                   | 0.146                                 | +0.2              | 2-6                                | 0.011                                 | +6.3              | 2                                    | 0.020                                 | +6.4              |
| 3                                   | 0.045                                 | +0.2              | 7 <sup>a</sup>                     | 0.019                                 | +7.3              | 3                                    | 0.023                                 | +5.1              |
| 4                                   | 0.005                                 | <+0.1             | 8 <sup>a</sup>                     | 0.204                                 | +0.1              | 4                                    | 0.035                                 | +5.8              |
| 5                                   | 0.004                                 | <+0.1             | 9 <sup>a</sup>                     | 0.147                                 | -0.5              | 5                                    | 0.036                                 | +2.6              |
| 6 <sup>a</sup>                      | 0.102                                 | -0.1              |                                    |                                       |                   | 6 <sup>a</sup>                       | 0.123                                 | -1.4              |
| 7 <sup>a</sup>                      | 0.118                                 | -0.2              |                                    |                                       |                   | 7 <sup>a</sup>                       | 0.087                                 | -1.3              |
|                                     |                                       |                   |                                    |                                       |                   | 8 <sup>a</sup>                       | 0.092                                 | -1.9              |

<sup>a</sup> Substance (base) extraite de la colonne après achèvement de la chromatographie.

de 25 ml, dont, après neutralisation jusqu'à pH 7 avec de l'acide acétique (5%), le solvant est évaporé. Les résidus ont été traités comme dans essais I-VII.

*Essai IX (Tableau V).* Nous avons fait couler 0.5 g de chlorhydrate de la base II, dilué dans 50 ml de méthanol, à travers une colonne de 26 cm de diamètre, remplie, jusqu'à la hauteur de 100 mm de polygalacturonate de sodium de degré de gonflement de 14 ml/g.

Le solvant utilisé a été le méthanol. L'élution a été réalisée, elle aussi, avec du méthanol, à la vitesse de 35 ml/h. Nous avons recueilli trois fractions de 30 ml et une quatrième fraction de 40 ml. La masse de la colonne a été divisée en deux parties, et nous avons procédé à l'extraction de chacune d'elles avec de l'acide chlorhydrique (2% de méthanol). Les extraits et les éluats ont été ensuite neutralisés avec du bicarbonate de sodium solide. Une fois le solvant évaporé, les résidus ont été traités comme dans essais I-VII.

## RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Nous avons étudié les effets du degré de gonflement de l'acide polygalacturonique dans des conditions assurant la résolution selon la réaction 1. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II. Nous voyons qu'il existe un degré de gonflement optimal de l'acide polygalacturonique, qui pour le système éther-méthanol-eau est de 20-25 ml/g environ. C'est dans ces conditions que nous avons procédé à la chromatographie des autres bases racémiques. Les résultats obtenus (Tableau III) prouvent qu'il est possible de résoudre des bases racémiques avec de l'acide polygalacturonique selon la réaction 1.

Pour étudier la deuxième réaction nous avons effectué la chromatographie du sel de la base II avec l'acide polygalacturonique. La colonne utilisée a été remplie d'acide polygalacturonique (degré de gonflement = 17 ml/g); l'éluant utilisé a été l'ammoniacque 0.1% dans du méthanol-éther. Les résultats polarimétriques figurent dans le Tableau IV. Il en résulte que dans les conditions (de la réaction 2) la séparation

| IV<br>Degré de gonflement = 23 ml/g |                                       |                   | V<br>Degré de gonflement = 27 ml/g |                                       |                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| No. de la fraction                  | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ | No. de la fraction                 | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ |
| 1                                   | 0.005                                 | + 3.1             | 1                                  | 0.002                                 | + 1               |
| 2                                   | 0.083                                 | + 20.1            | 2                                  | 0.027                                 | + 5.8             |
| 3                                   | 0.047                                 | + 3.7             | 3                                  | 0.024                                 | + 5               |
| 4                                   | 0.013                                 | + 0.9             | 4                                  | 0.024                                 | + 4.5             |
| 5                                   | 0.021                                 | - 0.8             | 5                                  | 0.031                                 | + 2.7             |
| 6 <sup>a</sup>                      | 0.106                                 | - 5.6             | 6 <sup>a</sup>                     | 0.120                                 | 0                 |
| 7 <sup>a</sup>                      | 0.089                                 | - 6.6             | 7 <sup>a</sup>                     | 0.081                                 | - 1.2             |
| 8 <sup>a</sup>                      | 0.044                                 | - 8.3             | 8 <sup>a</sup>                     | 0.089                                 | - 2.4             |

chromatographique des bases racémiques est possible. Il est intéressant de signaler que le pH des éluats contenant l'antipode (+) est de 6.5 à 7, mais si le pH atteint 7.5 on est en présence d'une inversion. Ce fait permet d'admettre qu'une résolution plus efficace des deux antipodes serait possible dans la réaction 2, si le pH de l'éluant était strictement régularisé.

Nous avons finalement étudié les possibilités de résolution des chlorhydrates d'une base chimique donnée sur du polygalacturonate de sodium (réaction 3). Nous avons chromatographié le chlorhydrate de la base I. Les résultats obtenus (Tableau V) prouvent que, dans les conditions établies, une pareille résolution est possible bien qu'avec une efficacité moindre.

TABLEAU III

ESSAIS DE SÉPARATION DES BASES RACÉMIQUES I, II ET III D'APRÈS LA RÉACTION I

| VI<br>(±)-thréo ester (I) |                                       |                   | IV<br>(±)-érythro ester (II) |                                       |                   | VII<br>(±)-Ritaline |                                       |                   |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------|
| No. de la fraction        | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ | No. de la fraction           | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ | No. de la fraction  | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ |
| 1                         | 0.007                                 | + 5.7             | 1                            | 0.005                                 | + 3.1             |                     |                                       |                   |
| 2                         | 0.090                                 | + 6.7             | 2                            | 0.083                                 | + 20.1            | 1-2                 | 0.025                                 | + 3.4             |
| 3                         | 0.060                                 | + 1.8             | 3                            | 0.047                                 | + 3.7             | 3-10                | 0.092                                 | + 4.2             |
| 4                         | 0.041                                 | + 1.7             | 4                            | 0.013                                 | + 0.9             | 11-17               | 0.060                                 | + 4.4             |
| 5                         | 0.030                                 | + 2.2             | 5                            | 0.021                                 | - 0.8             | 18 <sup>a</sup>     | 0.003                                 | 0                 |
| 6                         | 0.022                                 | + 1.4             | 6 <sup>a</sup>               | 0.106                                 | - 5.6             | 19 <sup>a</sup>     | 0.002                                 | 0                 |
| 7                         | 0.012                                 | + 1.9             | 7 <sup>a</sup>               | 0.089                                 | - 6.6             | 20 <sup>a</sup>     | 0.235                                 | - 1.8             |
| 8 <sup>a</sup>            | 0.112                                 | - 2.1             | 8 <sup>a</sup>               | 0.044                                 | - 8.3             |                     |                                       |                   |
| 9 <sup>a</sup>            | 0.077                                 | - 2.8             |                              |                                       |                   |                     |                                       |                   |

<sup>a</sup> Substance (base) extraite de la colonne après achèvement de la chromatographie.

TABLEAU IV

ESSAI VIII—SÉPARATION DE LA BASE I D'APRÈS LA RÉACTION 2

| No. de la fraction | pH de l'éluat | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ |
|--------------------|---------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1-12               | <6.5          | <0.001                                | 0                 |
| 13                 | 6.5           | 0.012                                 | +10               |
| 14                 | 6.5           | 0.019                                 | +6.5              |
| 15                 | 7             | 0.042                                 | +4                |
| 16-17              | 7.5           | 0.103                                 | +2                |
| 18                 | 7.5           | 0.044                                 | +2                |
| 19                 | 7.5           | 0.051                                 | -1.5              |
| 20                 | 7.5           | 0.043                                 | -3                |
| 21                 | 7.5           | 0.026                                 | -4.5              |
| 22                 | 7.5           | 0.026                                 | -23               |
| 23                 | 7.5           | 0.017                                 | -18               |
| 24-30              | 7.5           | <0.001                                | 0                 |

TABLEAU V

ESSAI IX—SÉPARATION DU CHLORHYDRATE DE LA BASE II SUR DE POLYGALACTURONATE DE SODIUM

| No. de la fraction | Poids de la base dans la fraction (g) | $[\alpha]_D^{20}$ |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1-2                | 0.001                                 | 0                 |
| 3                  | 0.068                                 | +3                |
| 4                  | 0.120                                 | +1.7              |
| 5 <sup>a</sup>     | 0.038                                 | -1.3              |
| 6 <sup>a</sup>     | 0.080                                 | -2.2              |

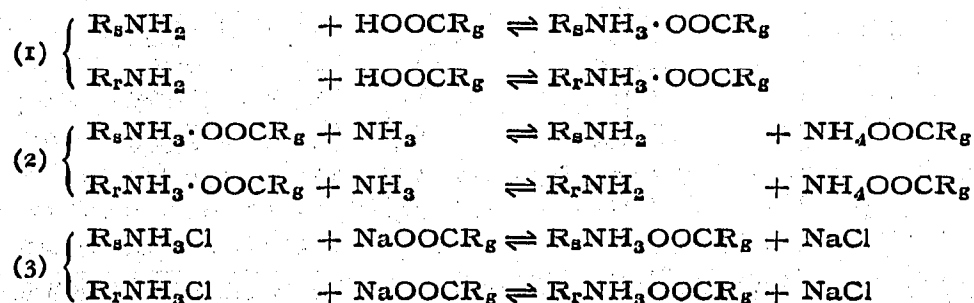
<sup>a</sup> Substance (base) extraite de la colonne après achèvement de la chromatographie.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions très vivement Mme. dr. M. LIAPOVA qui nous a aimablement fourni les bases I et II, et M. le dr. A. ORAHOVATZ de l'Institut de Chimie organique de l'Académie des Sciences, qui nous a fourni la ritaline.

## RÉSUMÉ

Les auteurs montrent que la résolution chromatographique des bases racémiques sur l'acide polygalacturonique est réalisable selon une des réactions suivantes:



Ils signalent, en outre, que le degré de gonflement de l'acide polygalacturonique dans le système eau-méthanol-éther influence fortement l'efficacité de la résolution. Ils obtiennent de meilleurs résultats en utilisant de l'acide polygalacturonique de degré de gonflement de 20-25 ml/g environ.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. JACQUES ET H. B. KAGAN, dans E. LEDERER (Rédacteur), *Chromatographie en chimie organique et biologique*, Vol. 1, Masson, Paris, 1959, p. 607.
- 2 E. L. ELIEL, *Stereochemistry of Carbon Compounds*, McGraw-Hill, New York, 1962, p. 63.
- 3 E. I. KLABUNOVSKY, *Assimétrichesky sintes*, Goskhimizdat, Moscou, 1960, pp. 169-187 (russe).
- 4 H. KREBS, *Die Trennung von Racematen auf chromatographischen Wege*, Westdeutscher Verlag, Köln, 1956.
- 5 H. KREBS, J. DIEWALD ET J. A. WAGNER, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 705.
- 6 M. KOTAKE, T. SAKAU, N. NAKAMURE ET S. SENOH, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 2973.
- 7 A. LÜTTRINGHAUS ET K. C. PETERS, *Angew. Chem.*, 78 (1966) 603.
- 8 K. SCHLÖGL ET H. MECHTLER, *Angew. Chem.*, 78 (1966) 606.
- 9 H. FALK ET K. SCHLÖGL, *Tetrahedron*, 22 (1966) 3047.
- 10 N. GRUBHOFFER ET L. SCHLEITH, *Z. Physiol. Chem.*, 296 (1954) 262; *Naturwiss.*, 40 (1953) 508; *Belg. Pat.*, 621, 135 (30.11.1962), *Swiss Appl.* 26.8.1961; *C.A.*, 60 (1964) 661f.
- 11 V. V. KORSHAK, S. V. ROGOJIN, V. A. DAVANKOV ET S. G. VARBANOV, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, (1966) 544 (russe).
- 12 A. SANTORO, *Baskerville Chem. J., City Coll. N.Y.*, 4 (1953) 1, 8; *C.A.*, 48 (1954) 4448 i.
- 13 CHR. KRATCHANOV ET M. POPOVA, *Trav. Sci. Inst. Tech. Ploudiv*, 13, Partie III (1966) 111 (bulgare).
- 14 CHR. KRATCHANOV, *Trav. Sci. Inst. Tech. Ploudiv*, 13, Partie III (1966) 99 (bulgare).

*J. Chromatog.*, 37 (1968) 297-303