

CHROM. 3889

Chromatographie de partage sur colonne de cellulose des oxyanions du phosphore

La séparation des divers oxyanions du phosphore a été réalisée par diverses techniques chromatographiques: chromatographie sur papier, sur couche mince et sur colonne d'échangeurs d'ions¹⁻³. Étant donné les excellents résultats obtenus par chromatographie sur papier ou sur couche mince de cellulose, nous avons essayé de reproduire les mêmes fractionnements sur des quantités plus grandes de produits, en utilisant les mêmes solvants en chromatographie sur colonne de cellulose⁴.

Matériel et méthodes

Oxyanions utilisés

Hypophosphite monosodique	NaH_2PO_2	Schering
Phosphite disodique	$\text{Na}_2\text{HPO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$	Prolabo
Phosphate monosodique	$\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$	Prolabo R. P.
Hypophosphate disodique	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_6, 6\text{H}_2\text{O}$	préparé suivant le mode opératoire de BLASER ET WORMS ⁵ .
Pyrophosphate tétrasodique	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7, 10\text{H}_2\text{O}$	Prolabo R. P.
Triphosphate pentasodique	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}, 6\text{H}_2\text{O}$	Progil

Mélange de polyphosphates: il s'agit d'un mélange d'orthophosphate, de pyrophosphate, de triphosphate et d'oxyanions condensés de longueur de chaîne allant jusqu'au décaphosphate, obtenus par dégradation d'un sel de Graham.

Chromatographie de partage sur colonne de cellulose

Cellulose. Nous avons utilisé la cellulose Whatman (standard grade) lavée avec HCl *M* pendant 24 h pour éliminer toutes traces de métaux alcalinoterreux et lourds. Il a en effet été montré⁶ que, dans le cas de la chromatographie sur papier, les séparations sont profondément perturbées par la présence de ces métaux et qu'il était indispensable de bien laver les papiers avec des solutions acides. Nous avons éliminé l'acide par lavage prolongé à l'eau distillée jusqu'à disparition des chlorures.

Colonnes. Les colonnes (80 cm à 110 cm de long, 1.3 à 1.7 cm de diamètre) ont été remplies de cellulose lavée en suspension dans l'eau distillée. La cellulose a ensuite été équilibrée avec les solvants à la température choisie pour effectuer la séparation. Les colonnes sont chargées par 20 à 50 mg de chaque oxyanion en solution aqueuse.

Solvants. Nous avons utilisé les solvants suivants pour la chromatographie sur colonne:

Solvant alcalin: isopropanol-isobutanol-ammoniaque (20 % NH_3)-eau (40:20:1:39, v/v)⁷.

Solvant acide: isopropanol-ammoniaque (20 % NH_3)-acide trichloracétique à 1000 g/l-eau (70:0.4:4:25.6, v/v)⁸.

Dosage du phosphore total. Les courbes d'élution ont été obtenues en dosant les phosphates par la méthode de BRIGGS⁹ dans les fractions obtenues lors de la chromatographie après élimination des alcools par chauffage à la flamme. Cette précaution est en

effet indispensable, car la présence de solvants organiques modifie la coloration et perturbe ainsi le dosage.

Dosage différentiel des phosphite, hypophosphate et orthophosphate. En appliquant la méthode précédente sans minéralisation oxydante, seul l'orthophosphate est dosé dans les fractions contenant des mélanges phosphite-orthophosphate ou orthophosphate-hypophosphate.

Chromatographie sur papier

L'analyse qualitative des différents oxyanions au niveau de chaque pic après chromatographie sur colonne a été effectuée par chromatographie sur papier, suivant les techniques de VOLMAR, EBEL ET BASSILI⁷ et de GRUNZE ET THILO⁸.

Résultats et discussion

La Fig. 1 montre le profil d'éluion d'une colonne de cellulose (80 cm de long, 1,7 cm de diamètre, vitesse d'écoulement: 16 ml/h), chargée respectivement par 20 mg d'hypophosphite, de phosphite, d'orthophosphate et d'hypophosphate en solution aqueuse, et élue à 20° par le solvant alcalin. On constate un certain empiètement des pics correspondant aux phosphite, orthophosphate et hypophosphate; la technique donne une séparation totale lorsqu'on est en présence des mélanges suivants: hypophosphite-phosphite, hypophosphite-orthophosphate, hypophosphite-hypophosphate, phosphite-hypophosphate, hypophosphite-phosphite-hypophosphate. Les séparations obtenues sont analogues à celles décrites, indépendamment de nous, par POLLARD, NICKLESS ET MURRAY¹⁰ qui ont fractionné avec un autre solvant, également sur colonne de cellulose, le mélange hypophosphite, phosphite et orthophosphate; comme dans notre cas, la séparation entre phosphite et phosphate obtenue par ces auteurs n'est pas parfaite.

Nous avons essayé de fractionner également les polyanions condensés du phosphore par la méthode que nous avons mise au point, mais aucune séparation n'a pu être obtenue par cette technique. Ce résultat n'est pas surprenant, car il a été montré⁶ que les valeurs des R_F des polyphosphates obtenues avec les solvants alcalins sont très voisines. Par contre, le mélange hypophosphite-phosphite-orthophosphate-mélange

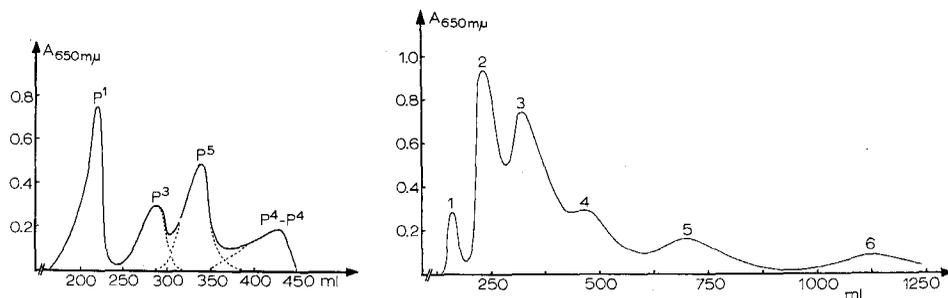


Fig. 1. Courbe d'éluion en solvant alcalin du mélange hypophosphite (P^1)-phosphite (P^3)-orthophosphate (P^5)-hypophosphate (P^4 - P^4) sur colonne de cellulose.

Fig. 2. Chromatographie sur colonne de cellulose en solvant acide à +4° d'un mélange d'orthophosphate et de phosphates de faible degré de condensation. Nature des pics: voir Résultats et discussion.

de polyphosphates peut être fractionné, car les valeurs des R_F des polyphosphates sont toutes inférieures à celle de l'orthophosphate.

Les résultats concernant les polyphosphates ayant été négatifs avec le solvant alcalin, nous avons essayé de les chromatographier en solvant acide qui donne d'excellents résultats en chromatographie sur papier⁶. La Fig. 2 montre la séparation d'un mélange d'oxyanions condensés et d'orthophosphate, après chromatographie sur colonne de cellulose (110 cm de long, 1.3 cm de diamètre, vitesse d'écoulement: 30 ml/h) éluée par le solvant acide à +4°. L'analyse par chromatographie sur papier (solvant acide) donne la composition suivante:

- pic 1: orthophosphate;
- pic 2: pyrophosphate + traces d'orthophosphate;
- pic 3: triphosphate + faibles quantités d'orthophosphate et de pyrophosphate;
- pic 4: tétraphosphate + ortho-, pyro- et triphosphate;
- pic 5: pentaphosphate apparemment pur;
- pic 6: hexaphosphate apparemment pur.

Comme le montre cette analyse qualitative des constituants des différents pics, nous n'avons pu empêcher une hydrolyse partielle des polyphosphates au cours de ce processus, malgré la réalisation de la chromatographie à +4°. C'est à partir du triphosphate que nous constatons une hydrolyse en orthophosphate et pyrophosphate, ce dernier est stable dans nos conditions. Au-delà du tétraphosphate, les pics ont une tendance à l'étalement et à l'aplatissement, ce qui provoque une dilution considérable. Au-delà de l'hexaphosphate, on n'observe pratiquement plus aucun pic.

En conclusion, la chromatographie de partage sur colonne de cellulose en solvant alcalin permet d'obtenir la séparation des oxyanions du phosphore de degré d'oxydation inférieur à 5 (hypophosphite, phosphite et hypophosphate) et de l'orthophosphate. En solvant acide, un fractionnement limité est obtenu avec les phosphates de faible degré de condensation, mais ce dernier est perturbé par l'hydrolyse concomitante de ces dérivés.

*Laboratoires de Chimie Biologique de la Faculté
des Sciences et de la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg (France)*

G. KEITH
G. DIRHEIMER
J. P. EBEL

- 1 H. HETTLER, dans M. LEDERER (Rédacteur), *Chromatographic Reviews*, Vol. I, Elsevier, Amsterdam, 1959, pp. 225-245.
- 2 J. P. EBEL, *Metodi di Separazione nella Chimica organica, Consiglio Nazionale della Ricerca, Accademia nazionale Roma*, (1963) p. 199.
- 3 J. P. EBEL, *Colloque International sur les Phosphates minéraux solides, Toulouse, 1967; Bull. Soc. Chim. France*, numéro spécial (1968) 1663.
- 4 G. KEITH, *Diplôme d'Études supérieures de Sciences physiques*, Strasbourg, 1964.
- 5 B. BLASER ET K. H. WORMS, *Z. Anorg. Allgem. Chem.*, 300 (1959) 250.
- 6 J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. France*, 20 (1953) 991.
- 7 Y. VOLMAR, J. P. EBEL ET Y. F. BASSILI, *Bull. Soc. Chim. France*, 20 (1953) 1085.
- 8 H. GRUNZE ET E. THILO, *Die Papierchromatographie der Kondensierten Phosphate*, Akademie-Verlag, Berlin, 1954, p. 1955.
- 9 A. P. BRIGGS, *J. Biol. Chem.*, 53 (1922) 13.
- 10 F. H. POLLARD, G. NICKLESS, J. D. MURRAY, *J. Chromatog.*, 27 (1967) 271.

Reçu le 25 novembre 1968