

CHROM. 6527

Note

Chromatographie sur papier de complexes métalliques de quelques acides aminés phosphoniques

Le remplacement du groupement $-\text{COOH}$ d'un acide aminé par le groupement $-\text{PO}_3\text{H}_2$ conduit aux acides aminés phosphoniques (AAP), dont quelques représentants ont été isolés des organismes vivants¹. Si les complexes métalliques des acides aminés carboxyliques naturels sont bien connus^{2,3}, les complexes métalliques de leurs analogues phosphoniques n'ont donné lieu qu'à un nombre restreint de travaux: on a décrit récemment les constantes de stabilité de quelques complexes d'acides aminés phosphoniques avec divers cations métalliques⁴⁻⁸. Le rôle favorisant de certains cations métalliques sur la transamination non enzymatique des AAP, récemment mis en évidence^{9,10}, nous a conduit à l'étude des complexes cuivriques des AAP.

Les complexes métalliques des acides aminés carboxyliques peuvent être facilement mis en évidence par électrophorèse sur papier^{11,12}, par chromatographie sur papier¹³⁻¹⁵ ou sur couche mince^{16,17}. La transposition de certaines de ces techniques dans la série phosphonique ne nous a pas permis d'obtenir des séparations suffisantes de l'AAP, de son complexe métallique et du métal lui-même; cette séparation a pu être réalisée en chromatographie sur papier et les résultats obtenus font l'objet de cette note.

Protocole expérimental

Les acides aminés phosphoniques proviennent en majeure partie de la firme Calbiochem; certains nous ont été procurés par le Professeur ISBELL (Department of Chemistry, Agricultural and Mechanical College of Texas, Texas, U.S.A.), ou ont été synthétisés dans notre laboratoire.

Les acides aminés sont dissous à la concentration de 10^{-2} M dans une solution aqueuse d'isopropanol à 10%; on ajoute à ces solutions la moitié de leur volume d'une solution 10^{-2} M d'un sel métallique (CuCl_2 , ZnSO_4 ou MnSO_4). Les mélanges ainsi obtenus sont directement déposés sur les chromatogrammes (10 μl).

La chromatographie a été réalisée avec du papier Schleicher et Schüll No. 2043b, selon la technique ascendante dans des cuves de dimensions 22 \times 22 cm. Nous avons retenu les deux phases solvantes suivantes: (A) pyridine-eau (65:35) et (B) phénol saturé d'une solution de tampon phosphate sodique $3,35 \cdot 10^{-2}$ M de pH 12.

Avec cette dernière phase, le papier, préalablement au dépôt, est imprégné de la solution tampon, essoré entre des feuilles de papier filtre et séché. Les chromatogrammes sont réalisés en double exemplaire. Sur l'un d'eux, les acides aminés sont révélés par immersion rapide de la feuille dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,5%, suivie d'un chauffage à l'étuve à 100° pendant quelques minutes. Les métaux sont mis en évidence sur le second chromatogramme grâce à une solution méthanolique d'acide rubéanique à 0,1% (Cu^{2+}) ou une solution chloroformique à 0,01% de dithizone (Zn^{2+} , Mn^{2+}).

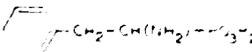
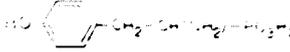
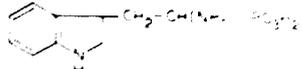
Résultats et discussion

Dans la plupart des cas, nous avons observé une migration plus importante du complexe cuivrique par rapport à celle de l'acide aminé libre, ce qui se traduit par un rapport $R = R_F(\text{AAP-Cu}^{2+})/R_F(\text{AAP})$ supérieur à l'unité (Tableau I);

TABLEAU I

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DE DIVERS ACIDES AMINÉS PHOSPHONIQUES ET DE LEUR COMPLEXE CUIVRIQUE

Les chiffres correspondent à la valeur du $R_F \cdot 100$ et au rapport $R = R_F(\text{AAP-Cu}^{2+})/R_F(\text{AAP})$. Le R_F du cuivre non complexé est de 0,88 avec la phase A; le métal ne migre pas lorsqu'on emploie la phase B.

Composé	Phase solvante A, pH 8,9			Phase solvante B, pH 7.		
	AAP	AAP-Cu ²⁺	R	AAP	AAP-Cu ²⁺	R
<i>Acides phosphoniques α-aminés aliphatiques simples</i>						
H ₂ N-CH ₂ -PO ₃ H ₂	25	41	1,6	8	8	1
CH ₃ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	30	50	1,6	16	26	1,6
CH ₃ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	32	49	1,5	27	51	1,9
CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	38	56	1,5	37	69	1,9
CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	40	64	1,6	42	79	1,9
(CH ₃) ₂ C(NH ₂)-PO ₃ H ₂	40	52	1,3	42	64	1,5
(CH ₃) ₂ CH-CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	41	55	1,3	38	64	1,7
(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	60	66	1,1	49	71	1,4
CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	61	67	1,1	48	74	1,5
HO-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	43	55	1,3	14	14	1
<i>Acides phosphoniques ω-aminés</i>						
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -PO ₃ H ₂	21	27	1,3	17	17	1
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -PO ₃ H ₂	26	26	1	35	35	1
<i>Diacides monoaminés</i>						
H ₂ O ₃ P-CH(NH ₂)-COOH	38	52	1,4	0	0	
H ₂ O ₃ P-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH	32	32	1	0	0	
H ₂ O ₃ P-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH	41	49	1,2	0	0	
H ₂ O ₃ P-CH(NH ₂)-CH ₂ -CH ₂ -COOH	54	55	1	0	0	
H ₂ O ₃ P-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	41	49	1,2	0	0	
<i>Diaminomonoacides</i>						
H ₂ N-CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	0	0		11	17	1,6
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	0	0		16	28	1,7
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	0	0		21	46	2,0
H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	0	0		33	78	2,3
H ₂ N-C(NH ₂)-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	0	0		48	88	1,8
<i>α-Aminoacides</i>						
H ₂ N-C(NH ₂)-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)-PO ₃ H ₂	0	0		68	65	1,4
<i>Acides phosphoniques α-aminés aromatiques</i>						
	47	51	1,1	10	66	1,3
	45	59	1,3	43	33	1,4
	48	48	1	38	63	1,6

ce phénomène paraît lié à l'engagement des groupements hydrophiles dans la formation du complexe. Les composés aliphatiques qui ne possèdent dans leur molécule que le groupement α -aminophosphonique se séparent donc aisément de leur complexe cuivrique en utilisant la phase solvante A; la séparation est toutefois moins bonne pour les analogues phosphoniques de la leucine et de l'isoleucine, composés dont le comportement chromatographique apparaît associé à l'importance de leur chaîne carbonée hydrophobe. La phase solvante B donne des séparations encore plus évidentes (Fig. 1) à l'exception du premier terme de la série.

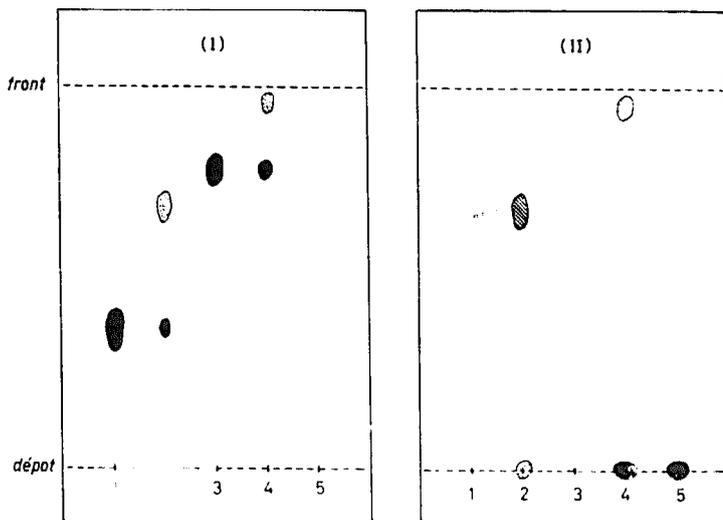


Fig. 1. Séparation chromatographique de l'acide amino-1-butylphosphonique et de la norvaline de leurs complexes cuivriques. Phase solvante B. I = Révélation par la ninhydrine; II = révélation par l'acide rubéanique. 1 = Acide amino-1-butylphosphonique; 2 = acide amino-1-butylphosphonique + CuCl_2 ; 3 = norvaline; 4 = norvaline + CuCl_2 ; 5 = CuCl_2 .

Pour les deux acides phosphoniques ω -aminés étudiés, la chromatographie met en évidence leur complexe cuivrique, malgré leur faible pouvoir complexant^{6,7}; le complexe ne se sépare toutefois de l'acide aminé libre que dans un cas. Les complexes métalliques des diacides aminés peuvent être séparés avec la phase solvante A et non avec la phase B, qui convient au contraire à la caractérisation des complexes métalliques des diaminomonoacides, ainsi qu'à ceux des dérivés cycliques étudiés.

Sur les chromatogrammes, les complexes cuivriques apparaissent sous la forme d'une tache très légèrement colorée en bleu; la révélation à la ninhydrine conduit à la formation d'une coloration rose, toutefois le complexe cuivrique de l'analogue phosphonique de l'acide aminomalonique se colore en jaune.

Les deux phases solvantes proposées permettent également, dans de nombreux cas, la séparation des acides aminés carboxyliques de leur chélate métallique: sur la Fig. 1, nous avons reproduit les séparations chromatographiques obtenues avec la norvaline et son analogue phosphonique. La révélation à l'acide rubéanique montre que la quantité de métal complexé apparaît plus importante avec le composé phosphonique qu'avec l'acide aminé carboxylique; ceci a été confirmé par des dosages

du cuivre au niveau des différentes taches par la méthode colorimétrique à la di-thizone¹⁸: cuivre déposé sur le chromatogramme (10 μ l) d'une solution d'acide aminé 10⁻² M renfermant CuCl₂ 10⁻² M) — 6.35 μ g; cuivre élué au niveau de la tache du complexe de l'acide amino-1-butylphosphonique — 3.05 μ g; cuivre élué au niveau de la tache du complexe de la norvaline — 0.65 μ g.

Nous avons enfin utilisé les phases A et B pour chromatographier quelques acides aminés phosphoniques et leurs complexes avec le zinc et le manganèse; la séparation a été satisfaisante, comme le montrent les quelques exemples ci-dessous obtenus avec la phase A:

	R_F
Acide aminométhylphosphonique	0.25
Acide aminométhylphosphonique, complexe Zn ²⁺	0.06
Acide aminométhylphosphonique, complexe Mn ²⁺	0.10
Acide amino-1-pentylphosphonique	0.40
Acide amino-1-pentylphosphonique, complexe Zn ²⁺	0.60
Acide amino-1-pentylphosphonique, complexe Mn ²⁺	0.10
Zn ²⁺	0.91
Mn ²⁺	0.60

La migration plus faible de certains de ces composés métalliques par rapport à l'acide aminé, résultat inverse de ce que nous avons noté avec le cuivre, paraît en rapport avec la possibilité de formation de complexes de structures différentes¹⁹.

Laboratoire de Biochimie Médicale,
U.E.R. III, Université de Bordeaux II,
146, Rue Léo Saignat, 33076-Bordeaux (France)

M. DARRIET
P. FÉNOT
A. CASSAIGNE
E. NEUZIL

- 1 J. S. KITTREDGE ET E. ROBERTS, *Science*, 104 (1969) 37.
- 2 A. E. MARTELL ET M. CALVIN, *Chemistry of the Metal Chelate Compounds*, Prentice Hall, New York, 1953.
- 3 J. P. GREENSTEIN ET M. WINITZ, *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 1, John Wiley, New York, 1961, p. 569.
- 4 M. WOZNIAK, J. NICOLE ET G. TRIDOT, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 272 (1971) 635.
- 5 D. GIRON, G. DUC ET G. THOMAS, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 272 (1971) 1022.
- 6 M. WOZNIAK, J. NICOLE ET G. TRIDOT, *Chim. Anal.*, 54 (1972) 147.
- 7 M. WOZNIAK, J. NICOLE ET G. TRIDOT, *Analysts*, 1 (1972) 498.
- 8 M. WOZNIAK, J. NICOLE ET G. TRIDOT, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1972) 4445.
- 9 E. NEUZIL, A. CASSAIGNE ET A. M. LACOSTE, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 270 (1970) 2724.
- 10 A. CASSAIGNE, A. M. LACOSTE ET E. NEUZIL, *Biochim. Biophys. Acta*, 252 (1971) 506.
- 11 M. SZWAJ ET M. KĄNSKI, *J. Chromatogr.*, 3 (1969) 425.
- 12 J. L. FRAHS, *J. Chromatogr.*, 54 (1971) 193.
- 13 M. T. BECK ET J. CSÁSZAR, *Acta Chem. Acad. Sci. Hung.*, 7 (1955) 495.
- 14 K. MURA, *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 24 (1950) 394.
- 15 F. KARCZINSKI, *Zes. Nauk. Wym. Szk. Pedagog. Gdańska. Mat. Fiz. Chem.*, 9 (1969) 137; *C. A.*, 72 (1970) 51517.
- 16 G. FARE ET D. C. H. SAMMONS, *Experientia*, 22 (1966) 66.
- 17 B. SARKAR ET T. P. A. KRUCK, *Can. J. Biochem.*, 45 (1967) 2047.
- 18 C. DUVAL, *Traité de micro-analyse minérale*, Vol. 3, Presses Sci. Int., Paris, 1959, p. 314.
- 19 P. FÉNOT, *Thèse Doctorat Pharmacia*, Bordeaux, à paraître.

Reçu le 5 décembre 1972