

CHROM. 6943

## SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE D'ACIDES AMINÉS PHOSPHORIQUES N-SUBSTITUÉS

J. LE POGAM, H. JENSEN et E. NEUZIL

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

(Reçu le 16 juillet 1973)

---

### SUMMARY

#### *Chromatographic separation of N-substituted aminophosphonic acids*

A description is given of various chromatographic systems leading to a good resolution of several substitution derivatives of aminophosphonic acids: 2,4-dinitrophenyl, 2,4,6-trinitrophenyl, 3,5-dinitropyridyl, 2,4-dinitro-5-aminophenyl, and dansyl derivatives.

---

### INTRODUCTION

La séparation chromatographique des acides aminés phosphoniques (AAP) naturels, aussi bien que celle des analogues phosphoniques des aminoacides carboxyliques obtenus par synthèse, a été réalisée sur différents supports: papier ordinaire<sup>1,2</sup>, diéthylaminoéthylcellulose<sup>3</sup> ou colonne de résines échangeuses d'ions<sup>4,5</sup>. L'isolement de protéines libérant à l'hydrolyse des AAP<sup>6</sup> et la description récente d'oligopeptides renfermant des AAP<sup>7</sup> ou des substances étroitement apparentées<sup>8</sup>, nous ont conduit à préparer les dérivés N-dinitro-2,4-phénylés et N-trinitro-2,4,6-phénylés des AAP<sup>9</sup>. Nous présentons ici quelques caractéristiques chromatographiques de ces substances, auxquelles nous avons adjoint divers dérivés dinitro-3,5-pyridylés, dinitro-2,4-amino-5-phénylés et dansylés des AAP.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *Produits utilisés*

Nous avons utilisé 17 acides aminés phosphoniques, en provenance de Calbiochem (Los Angeles, Calif., U.S.A.): acides aminométhylphosphonique (Gly-Ph)\*, amino-1-éthylphosphonique (Ala-Ph), amino-1-propylphosphonique (1-AmPrPh), amino-1-butylphosphonique (Norval-Ph), amino-1-pentylphosphonique (Norleu-Ph), amino-1-méthyl-1-éthylphosphonique (1-Am-1-MeEtPh), amino-1-méthyl-2-propyl-

---

\* Lorsque l'acide aminé phosphonique est l'analogue d'un acide aminé carboxylique naturel, on adopte une nomenclature simplifiée: par exemple, l'acide aminométhylphosphonique, analogue de la glycine, sera désigné par Gly-Ph.

phosphonique (Val-Ph), amino-2-éthylphosphonique ( $\beta$ -Ala-Ph, ciliatine), amino-3-propylphosphonique (GABA-Ph), amino-2-phosphono-3-propionique (Asp-Ph), amino-2-phosphono-4-butyrique (Glu-Ph); diamino-1,2-éthylphosphonique (DiAm-1,2-EtPh), diamino-1,3-propylphosphonique (DiAm-1,3-PrPh), diamino-1,4-butylphosphonique (Orn-Ph), diamino-1,5-pentylphosphonique (Lys-Ph), amino-1-phényl-2-éthylphosphonique (Phe-Ph) et amino-1-(*p*-OH-phényl)2-éthylphosphonique (Tyr-Ph).

Les dérivés dinitrophénylés (DNP-dérivés) et trinitrophénylés (TNP-dérivés) ont été le plus souvent obtenus à l'état cristallisé<sup>9</sup>, par action sur l'acide aminé libre de fluoro-1-dinitro-2,4-benzène et de l'acide trinitro-2,4,6-benzène sulfonique, selon des techniques décrites par ailleurs<sup>10,11</sup>. Les dérivés dinitropyridylés (DNPyr-dérivés) ont été préparés à partir de la chloro-2-dinitro-3,5-pyridine, en suivant la méthode de Signor *et al.*<sup>12</sup>. Les dérivés dinitroaminophénylés (DNAP-dérivés) sont obtenus par action de la dinitro-2,4-fluoro-5-aniline, selon les indications de Bergmann et Bentov<sup>13</sup>. La dansylation a enfin été réalisée par la méthode de Boulton et Busch<sup>14</sup>.

Lorsque le dérivé N-substitué n'a pas été obtenu à l'état cristallin, l'étude chromatographique a été effectuée avec la solution aqueuse dans laquelle la réaction de substitution a été obtenue.

### Techniques chromatographiques

*Chromatographie sur papier.* Nous avons utilisé la technique de chromatographie descendante, en cuves Chromatotank Shandon, à la température de 20°. Dans nos différents essais, les supports employés ont été les papiers Whatman 4, Whatman 3MM ou le papier échangeur d'ions Whatman ET-81 (ECTEOLA-cellulose). Les DNP- et TNP-dérivés ont été dissous dans l'acétone (1 mg/ml) et le dépôt constitué par 10  $\mu$ l de cette solution; pour les dérivés non obtenus sous forme cristallisée, (DNPyr-, DNAP- et dansyl-dérivés) la chromatographie a été réalisée sur 10  $\mu$ l du mélange réactionnel acidifié. Les phases solvantes suivantes ont été utilisées:

- (A) tampon de Knight, 0.02 M (pH=4)<sup>15</sup>;
- (B) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M (pH=6)<sup>16,17</sup>;
- (C) tampon de Knight, 0.02 M (pH=6)<sup>15</sup>;
- (D) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, M/15-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, M/15 (pH=6.8)<sup>18</sup>;
- (E) sol. sat. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-eau (1:7)<sup>17</sup>;
- (F) sol. sat. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sol. sat. NaCl-H<sub>2</sub>O (1:1:6)<sup>17</sup>;
- (G) sol. sat. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sol. sat. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (2:10:18)<sup>17</sup>;
- (H) *n*-butanol-eau (518:84)<sup>13</sup>;
- (J) *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5)<sup>19,20</sup>;
- (K) *n*-butanol-acide propionique-eau (12:4:4)<sup>1</sup>;
- (L) éther de pétrole (Éb. 40-60°)-acide acétique-eau (10:9:1)<sup>14</sup>;
- (M) éther de pétrole (Éb. 40-60°)-toluène-acide acétique-eau (50:50:85:15)<sup>14</sup>.

Après séchage du chromatogramme, les taches des divers dérivés nitrés sont visibles en lumière naturelle; elles se présentent sous forme de taches noires sous la lampe à ultra-violet. On peut également mettre en évidence au niveau des taches le groupement phosphonique par immersion rapide du chromatogramme dans le réactif de Chess et Bernart<sup>24</sup>; la coloration du bleu de molybdène se superpose à la coloration jaune propre à ces dérivés pour former des taches vertes. Les dérivés dansylés présentent une intense fluorescence en lumière ultra-violette.

*Chromatographie en couche mince.* Cette technique n'a été mise en oeuvre que pour l'étude chromatographique des dérivés dansylés; les phases solvantes et les supports suivants ont été utilisés:

chloroforme-acide acétique-eau (50:45:5)<sup>21</sup>, silica gel G;  
 chloroforme-méthanol-acide acétique (75:20:5)<sup>21</sup>, silica gel G;  
 chloroforme-éthanol-acide acétique (38:4:3)<sup>22</sup>, silica gel G;  
 chloroforme-*tert.*-butanol-acide acétique (6:3:1)<sup>22</sup>, silica gel G;  
 chloroforme-alcool benzylique-acide acétique (70:30:3)<sup>22</sup>, alumine;  
 chloroforme-méthanol-acétate d'éthyle-acide acétique (30:20:50:1)<sup>21</sup>, silica gel G;  
 chloroforme-éthanol-acétate d'éthyle-acide acétique (45:4:70:4)<sup>21</sup>, silica gel G;  
 benzène-pyridine-acide acétique (16:4:1)<sup>22</sup>, silica gel G;  
 benzène-pyridine-acide acétique (80:20:2)<sup>23</sup>, silica gel G;  
 benzène-cyclohexène-méthanol (85:10:5)<sup>21</sup>, silica gel G;  
*n*-butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24)<sup>21</sup>, alumine.

## RESULTATS

### *DNP-dérivés*

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le papier Whatman 3MM; les caractéristiques chromatographiques de nos produits sont groupées dans le Tableau I; nous y avons ajouté les valeurs de  $R_F$  du dinitro-2,4-phénol, produit de décomposition

**TABLEAU I**  
**CHROMATOGRAPHIE DES DNP-DÉRIVÉS DES ACIDES AMINOPHOSPHONIQUES**  
 Papier Whatman 3MM. La lettre indique la phase solvante.

<i>DNP-aminoacides</i>	<i>Valeurs des <math>R_F \times 100</math></i>						
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>J</i>
Gly-Ph	82	52	63	62	54	05	49
Ala-Ph	89	54	70	69	44	14	58
1-AmPrPh	89	58	73	71	46	21	66
Norval-Ph	89	58	71	65	61	37	70
Val-Ph	91	58	72	68	61	30	73
$\beta$ -Ala-Ph (ciliatine)	81	45	61	61	34	10	57
GABA-Ph	83	44	63	62	33	12	63
Asp-Ph		22					
Glu-Ph		58					
DiAm-1,2-Et-Ph	66	33	21	21	04	21	65
DiAm-1,3-PrPh	66	25	39	38	16	25	68
Orn-Ph	53	19	34	31	10	30	68
Lys-Ph	66	20	35	30	24	28	67
Phe-Ph	87	50	63	59	55	38	73
Tyr-Ph	86	53	74	74	65	22	74
Phosphoéthanolamine		49				17	53
2,4-Dinitrophénol	64	25	41-55	42-54	22-32	50	89

TABLEAU II

## CHROMATOGRAPHIE DES DNP-DÉRIVÉS DES ACIDES AMINÉS CARBOXYLIQUES ET DES ACIDES AMINÉS PHOSPHONIQUES

Papier Whatman 3MM.

<i>DNP-dérivé</i>	<i>Valeur des R<sub>F</sub> × 100</i>			
	<i>Phase solvante B</i>		<i>Phase solvante H</i>	
	<i>R = COOH</i>	<i>R = PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub></i>	<i>R = COOH</i>	<i>R = PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub></i>
DNP-NH-CH <sub>2</sub> -R	52	24	05	17
DNP-NH-CH(CH <sub>3</sub> )-R	54	32	14	32
DNP-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -R	45	30	10	54
DNP-NH-CH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )-R	58	34	21	47
DNP-NH-CH( <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )-R	58	34	37	58
DNP-NH-CH( <i>iso</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )-R	58	37	30	56
DNP-NH-CH(R)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-DNP	19	5	30	55
DNP-NH-CH(R)-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	50	24	38	70
DNP-NH-CH(R)-CH <sub>2</sub> ( <i>p</i> -DNP-O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )	53	0	22	60

TABLEAU III

## CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE DES TNP-, DNPyr- ET DNAP-ACIDES AMINÉS PHOSPHONIQUES

Solvant: *n*-Butanol-acide acétique-eau (12:3:5). Papier Whatman 3MM.

<i>Acides aminés phosphoniques</i>	<i>R<sub>F</sub> × 100</i>		
	<i>TNP</i>	<i>DNPyr</i>	<i>DNAP</i>
Gly-Ph	58	38	41
Ala-Ph	69	50	53
1-AmPrPh	73	60	59
1-Am-1-MeEtPh	77	68	64
Norval-Ph	78	69	72
Val-Ph	78	69	67
Norleu-Ph	82	71	76
β-Ala-Ph (ciliatine)	58	54	55
GABA-Ph	71	63	63
Asp-Ph	56	44	49
Glu-Ph	59	52	43
DiAm-1,2-Et-Ph	mono-	47	
	bis-	72	51
DiAm-1,3-Pr-Ph	mono-	40	
	bis-	72	36
Orn-Ph	mono-	42	
	bis-	77	45
Lys-Ph	mono-	45	
	bis-	76	52
Phe-Ph	74	73	69
Tyr-Ph	65	79	61

du fluoro-1-dinitro-2,4-benzène en milieu alcalin que l'on retrouve aussi bien dans l'éther diéthylique, surtout à l'extraction du DNP-dérivé, que dans la phase aqueuse du milieu réactionnel après extraction.

Nous avons comparé sur quelques exemples le comportement chromatographique des DNP-dérivés d'acides aminés dans la série carboxylique et dans la série phosphonique: le remplacement du groupement carboxylique par un groupement phosphonique s'accompagne habituellement d'une baisse importante de la valeur du  $R_F$  (Tableau II); nous retrouvons les règles générales indiquées par l'un de nous<sup>1</sup> dans le cas des acides aminés libres; toutefois cette règle s'inverse lorsqu'on utilise comme phase solvante la solution tampon B.

Nous avons décrit antérieurement la séparation chromatographique de la ciliatine et de l'O-phosphoéthanolamine<sup>3</sup>; sous la forme de leurs DNP-dérivés, ces deux produits ne donnent lieu à aucune séparation satisfaisante avec les systèmes de phases solvantes utilisés (papier Whatman 3MM avec phases B, H et J; papier ET-81 avec les phases A et C).

#### TNP-, DNPy- et DNAP-dérivés

Pour ces différents dérivés, l'utilisation de papier Whatman 3MM et de la phase solvante J nous a fourni les meilleurs résultats (Tableau III).

La recherche du meilleur type de dérivé N-substitué à préparer pour obtenir une bonne séparation d'acides aminés phosphoniques particuliers est facilitée par le diagramme récapitulatif de la Figure 1.

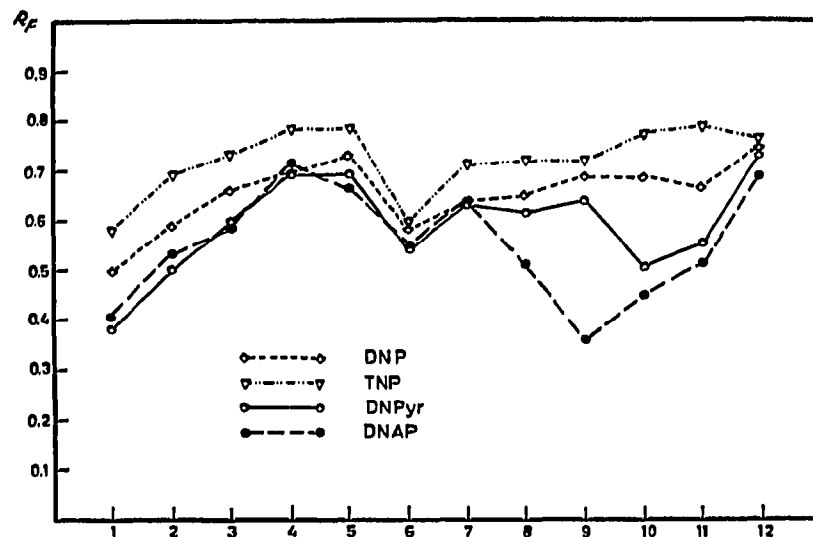


Fig. 1. Comparaison chromatographique de quatre types de dérivés N-substitués d'acides aminés alkylophosphoniques. Papier Whatman 3MM. Solvant: *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5). 1=Gly-Ph; 2=Ala-Ph; 3=1-AmPrPh; 4=Norval-Ph; 5=Val-Ph; 6= $\beta$ -Ala-Ph (ciliatine); 7=GABA-Ph; 8=DiAm-1,2-EtPh; 9=(bis)DiAm-1,3-PrPh; 10=(bis)Orn-Ph; 11=(bis)Lys-Ph; 12=Phe-Ph.

*Dérivés dansylés*

La chromatographie sur couche mince, très efficace dans la séparation des dérivés dansylés des acides aminés carboxyliques, s'est montrée décevante avec les analogues phosphoniques: avec les nombreuses phases solvantes citées ci-dessus, les dérivés N-dansylés des AAP ne migrent pratiquement pas.

Les meilleures séparations ont été obtenues avec le papier Whatman ET 81 et les phases solvantes C et D (Tableau IV).

TABLEAU IV

## SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES DANSYL-AMINÉS PHOSPHONIQUES

tr = trainée; C, D, J, K, L, M = phases solvantes utilisées.

Dansyl acides aminés	$R_F \times 100$						
	Whatman ET-81		Whatman 3MM		Whatman 4		
	C	D	J	K	J	L	M
Gly-Ph	24		53	40	62	90	76
Ala-Ph	31	34					
1-AmPrPh	29	38	75				
1-Am-1-MeEtPh	28	42	77 tr				
Norval-Ph	28	38	78				
Val-Ph	27	42					79
Norleu-Ph	22	38					78
$\beta$ -Ala-Ph (ciliatine)	24	32	63	48	70 tr	91	78
GABA-Ph	24	40			75 tr	97	77
Asp-Ph	32	39,5					75
Glu-Ph	30	40	58				78
DiAm-1,2-EtPh	44	8 et 53	58 et 70	60 tr	75 tr	95	78
DiAm-1,3-PrPh	39 et 54	11 et 49			80 tr		
Orn-Ph	39	10 et 50			82 tr		
Lys-Ph	35	10 et 51	58 et 72	55 tr	75 tr	91	79
Phe-Ph	16	33			71 tr		
Tyr-Ph					71 et 87		

## RÉSUMÉ

Les auteurs ont indiqué les systèmes chromatographiques qui permettent une bonne séparation de divers dérivés de substitution des acides aminés phosphoniques: dinitro-2,4-phénylés, trinitro-2,4,6-phénylés, dinitro-3,5-pyridylés, dinitro-2,4-amino-5-phénylés et dansylés.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. Neuzil et A. Cassaigne, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 10 (1967) 3994.
- 2 A. J. de Koning, *Biochim. Biophys. Acta*, 202 (1970) 187.
- 3 E. Neuzil, H. Jensen et L. Le Pogam, *J. Chromatogr.*, 39 (1969) 238.
- 4 B. L. Roop et W. E. Roop, *Anal. Biochem.*, 25 (1968) 260.
- 5 A. J. de Koning, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 185.

- 6 W. A. Warren, *Ph. D. Dissertation*, Univ. of Amherst, Mass. (U.S.A.), 1968.
- 7 E. Neuzil, H. Jensen et J. Pralon, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 109 (1970) 85.
- 8 E. Bayer, K. H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmaier, S. Jessipov, W. A. König et H. Zähler, *Helv. Chim. Acta*, 55 (1972) 224.
- 9 J. Le Pogam, H. Jensen, E. Neuzil et C. Garrigou-Lagrange, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, sous presse.
- 10 K. R. Rao et H. A. Sober, *J. Amer. Chem. Soc.*, 76 (1954) 1328.
- 11 T. Okuyama et K. Satake, *J. Biochem. (Tokyo)*, 47 (1960) 454.
- 12 A. Signor, E. Scoffone et L. Biondi, *Gazz. Chim. Ital.*, 93 (1963) 73.
- 13 E. D. Bergmann et M. Bentov, *J. Org. Chem.*, 26 (1961) 1480.
- 14 A. A. Boulton et I. E. Bush, *Biochem. J.*, 92 (1964) 11.
- 15 C. S. Knight, *Chromatogr. Rev.*, 4 (1962) 73.
- 16 A. L. Levy, *Nature (London)*, 174 (1954) 126.
- 17 R. L. Munier et G. Sarrazin, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 347.
- 18 J. C. Breton, *Thèse Doct. Méd.*, Bordeaux, 1958, 241 pp.
- 19 I. Smith, *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, W. Heinemann, Londres, 1966, Vol. 1, p. 82.
- 20 M. Roverly et C. Fabre, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35 (1953) 541.
- 21 N. Seiler et M. Wiechmann, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 351.
- 22 Z. Deyl et J. Rosmus, *J. Chromatogr.*, 20 (1965) 514.
- 23 I. B. Dawid, T. C. French et J. M. Buchanan, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2179.
- 24 D. N. Bernhart et W. B. Chess, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 1026.