

CHROM. 7471

Note

Séparation de quelques dérivés de l'agmatine par électrophorèse et chromatographie sur papier

F. LARHER, D. LE RUDULIER et G. GOAS

Laboratoire de Biologie Végétale, Laboratoire de Physiologie Végétale 1er Cycle, Faculté des Sciences Biologiques, Université de Rennes, Avenue du Général Leclerc, 35031 Rennes Cedex (France)

(Reçu le 21 janvier 1974; manuscrit modifié reçu le 27 mars 1974)

Au cours de l'étude du métabolisme de l'agmatine dans les rameaux de *Limonium vulgare* Mill. et dans les jeunes plantes de *Soja hispida* Moench., il est apparu des composés dont la séparation et l'identification a présenté des difficultés. Il était donc nécessaire de mettre au point une technique qui permette d'isoler les produits pouvant se former au cours de l'utilisation de l'agmatine: urée, N-carbamylputrescine, N,N'-dicarbamylputrescine, γ -guanidinobutyraldéhyde, acide γ -guanidinobutyrique, arcaïne, putrescine, spermidine et spermine. Lopez-Gorge et Monteoliva¹ ont montré que la méthode de Biserte *et al.*² était applicable à la séparation des dérivés guanidiques. Cette méthode qui nous a permis aussi de séparer la N-carbamylputrescine, ne donne qu'une très mauvaise résolution de la N,N'-dicarbamylputrescine et de l'urée d'une part, de l'agmatine et des polyamines d'autre part. C'est pourquoi nous avons dû compléter la méthode en combinant à l'électrophorèse trois chromatographies parallèles.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Origine des composés utilisés

Les produits utilisés sont des produits commerciaux ou des produits obtenus au laboratoire. L'agmatine sulfate nous a été fournie par les établissements Sigma (St. Louis, Mo., É.U.), la putrescine, la spermidine et la spermine par Fluka (Buchs, Suisse) et l'urée par Merck (Darmstadt, R.F.A.). L'acide γ -guanidinobutyrique nous a été aimablement préparé par le Prof. A. Brunel du Centre de Physiologie Végétale de l'Université Paul Sabatier de Toulouse. La N-carbamylputrescine et la N,N'-dicarbamylputrescine ont été synthétisées, par action du cyanate de potassium sur le dichlorhydrate de putrescine³, au Laboratoire de Physicochimie Structurale du Prof. R. Carrié, grâce à l'obligeance de J. Hamelin (U.E.R. Structure et Propriétés de la Matière, Université de Rennes). Nous avons préparé le γ -guanidinobutyraldéhyde par transamination de l'agmatine sur l'acide α -cétoglutarique⁴, en présence d'une suspension de poudre de jeunes plantes de *Soja hispida*; le protocole expérimental retenu est celui décrit par Guillon⁵ lors de l'étude des transaminases des plantules de *Pinus pinea* L.

Techniques de séparation

La technique utilisée associe l'électrophorèse en haute tension à la chromatographie descendante sur papier; elle met en oeuvre la méthode de couplage décrite par Efron⁶ qui consiste à coudre, sur une feuille de papier Whatman 3 MM, la bande intéressante de l'électrophorégramme.

L'électrophorèse est effectuée à l'appareil Phérogaph, sur papier Whatman 3 MM, 57 × 35 cm, imprégné d'une solution tamponnée de pH 3.9 (pyridine-acide acétique-eau, 30:100:3870)²; le champ électrique est fixé à 45 V/cm. Une migration de 1 h 35 min permet de séparer les composés étudiés en trois groupes suivant leurs vitesses décroissantes de migration: (I) les polyamines, l'agmatine et l'arcaïne; (II) la N-carbamylputrescine, le γ -guanidinobutyraldéhyde et l'acide γ -guanidinobutyrique; (III) l'urée et la N,N'-dicarbamylputrescine.

Le premier groupe est repris en chromatographie dans le mélange *n*-butanol-pyridine-acide acétique-eau (4:1:1:2) pendant 24 h. Dans ces conditions, on sépare de façon satisfaisante l'arcaïne, l'agmatine, la putrescine, la spermidine et la spermine. De même, les constituants du second groupe sont isolés par une chromatographie de 14 h dans le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5). Enfin, pour le troisième groupe où l'urée et la N,N'-dicarbamylputrescine sont superposées, une chromatographie de 14 h dans le mélange phénol-eau-ammoniaque (150:50:1) permet leur séparation.

Réactifs de révélation

Les polyamines, l'agmatine et la N-carbamylputrescine sont révélées par une solution de ninhydrine à 0.4% dans le mélange *n*-butanol-acide acétique (100:4) et chauffage à 100°. L'arcaïne, le γ -guanidinobutyraldéhyde, l'acide γ -guanidinobuty-

TABLEAU I

MOBILITÉS ÉLECTROPHORÉTIQUES (R_F) ET R_F DES DÉRIVÉS DE L'AGMATINE

R_F : mobilité électrophorétique par rapport à la putrescine. Solvant 1: *n*-butanol-pyridine-acide acétique-eau (4:1:1:2); solvant 2: *n*-butanol-acide acétique-eau (12:3:5); solvant 3: phénol-eau-ammoniaque (150:50:1).

Composés	Électrophorèse (R_F)	Chromatographie (R_F)		
		Solvant 1	Solvant 2	Solvant 3
Groupe I				
Putrescine	1.00	0.25		
Spermidine	0.93	0.17		
Spermine	0.87	0.11		
Agmatine	0.85	0.33		
Arcaïne	0.71	0.46		
Groupe II				
N-carbamylputrescine	0.52		0.40	
γ -Guanidinobutyraldéhyde	0.51		0.61	
Acide γ -guanidinobutyrique	0.29		0.53	
Groupe III				
Urée	0.06			0.74
N,N'-dicarbamylputrescine	0.06			0.97

rique et de nouveau l'agmatine sont localisés par le réactif au diacétyle- α -naphтол⁷. Enfin, l'urée, la N,N'-dicarbamylputrescine, mais aussi la N-carbamylputrescine, donnent une couleur jaune vif sur fond blanc avec le réactif d'Ehrlich modifié⁸. Tous les révélateurs sont utilisés par pulvérisation.

RÉSULTATS

Les mobilités électrophorétiques, par rapport à celle de la putrescine R_p , et les R_F des différents composés étudiés figurent dans le Tableau I.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Lopez-Gorge et M. Monteoliva, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 300.
- 2 G. Biserte, P. Boulanger et P. Paysant, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 2067.
- 3 T. A. Smith et J. L. Garraway, *Phytochemistry*, 3 (1964) 23.
- 4 K. Hasse et G. Schmidt, *Biochem. Z.*, 337 (1963) 69.
- 5 Y. Guillon, *C. R. Acad. Sci.*, 253 (1961) 2583.
- 6 M. L. Efron, dans I. Smith (Rédacteur), *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. II, Heinemann, Londres, 2^{ème} éd., 1968, Ch. 5, p. 173.
- 7 I. Smith et H. G. Horsewell, dans I. Smith (Rédacteur), *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. I, Heinemann, Londres, 3^{ème} éd., 1969, Ch. II, p. 286.
- 8 R. Zimmermann, *Naturwissenschaften*, 43 (1956) 399.