

MÉTABOLISME DES DÉRIVÉS GUANIDYLÉS

III. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES DÉRIVÉS GUANIDYLÉS

par

JEAN ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI ET JEAN LOUIS HATT

Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, Collège de France, Paris, et

Laboratoire maritime du Collège de France, Concarneau (France)

Nous avons établi dans un travail antérieur les conditions dans lesquelles il est possible de réaliser la chromatographie sur papier des guanidines monosubstituées, celle de la guanidine libre et des dérivés disubstitués n'ayant pas été élaborée par ailleurs¹. Or, l'étude du métabolisme général de ces corps et de leur répartition dans les organismes vivants ne saurait être réalisée si l'on ne peut saisir la filiation biologique des uns aux autres. Aussi avons-nous cherché à élaborer une méthode générale d'analyse des dérivés guanidiques. La réaction colorée à l' α -naphtol additionné d'hypobromite de sodium, dite de SAKAGUCHI, est caractéristique des guanidines monosubstituées, mais celles de la guanidine ou de ses dérivés disubstitués actuellement connus ne sont pas spécifiques. Nous avons essayé d'élaborer une méthode permettant de caractériser les différentes guanidines mono- et disubstituées, en associant la séparation microchromatographique sur papier à la révélation par le mélange de diacétyle et d' α -naphtol² ou le mélange de nitroprussiate et de ferricyanure alcalin^{3,4}. Le présent mémoire rend compte des résultats obtenus.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Essais avec des corps de référence

Méthodes de révélation des chromatogrammes. Nous avons utilisé trois types de réactions colorées pour révéler les taches chromatographiques.

1. La réaction à l' α -naphthol, dite de Sakaguchi, a été appliquée dans les conditions suivantes : le papier est d'abord pulvérisé avec un mélange fraîchement préparé de 0.2 ml de NaOH 40% + 0.2 ml de solution d'urée à 40% + 0.2 ml de solution alcoolique d' α -naphthol à 1% + eau distillée q.s.p. 10 ml. Après séchage à froid, le papier est pulvérisé avec un mélange fraîchement préparé de 7 ml d'eau distillée et de 3 ml de solution stock d'hypobromite de sodium (0.9 ml de brome dans 100 ml de NaOH 10%). La solution stock d'hypobromite de sodium doit être préparée une semaine avant son emploi et ne peut être conservée plus d'un mois. La réaction de Sakaguchi ainsi appliquée est positive avec les guanidines monosubstituées et permet de déceler avec certitude des concentrations de celles-ci de l'ordre du microgramme.

2. Un deuxième procédé de révélation utilise la réaction au nitroprussiate-ferricyanure de potassium décrite par différents auteurs^{3,4,5} et commune à la guanidine et à l'ensemble des dérivés mono- et disubstitués. Des solutions stock de nitroprussiate de sodium à 10%, de ferricyanure de potassium à 10% et de soude à 10% sont mélangées à volumes égaux, une demi-heure avant l'emploi. Quelques minutes après la pulvérisation du réactif, les taches chromatographiques paraissent en rouge sur fond jaune. La coloration est en général stable, sauf dans les cas où la concentration en dérivés guanidiques est faible. La guanidine, les dérivés monosubstitués et les disubstitués asymétriques (créatine, diméthylguanidine) donnent des réactions positives. Les taches de créatinine n'apparaissent pas.

raissent que très lentement. Des concentrations de dérivés guanidylés de l'ordre de 2 μg sont parfaitement décelables en chromatographie monodimensionnelle.

3. Le troisième procédé de révélation met en jeu la réaction avec le mélange de diacétyle et d' α -naphtol décrite par BARRIT² et utilisée pour le dosage de la créatine^{6,7}. On mélange au moment de l'emploi 0.1 ml de diacétyle avec 15 ml de solution à 1% d' α -naphtol dans la soude à 6%. Quelques minutes après de la pulvérisation (2 à 10 minutes) les taches chromatographiques apparaissent en bleu-violet sur un fond beige qui brunit progressivement, ce qui les rend difficiles à distinguer après quelques heures. La créatinine ne donne pas de coloration, mais la guanidine et les dérivés disubstitués (créatine, diméthylguanidine asymétrique) sont décélés avec une sensibilité plus grande (2 μg) que les monosubstitués (20 μg). Cette particularité permet, par un choix convenable de concentrations en composés guanidiques, de ne révéler que les produits disubstitués et de distinguer ces derniers des monosubstitués lorsqu'ils présentent les mêmes R_F .

Séparation chromatographique. La plupart des essais ont été réalisés suivant les techniques habituelles de chromatographie, à 20°, avec papier Whatman No. 1. Les mélanges suivants ont été particulièrement employés:

- I. Pyridine, alcool isoamyllique, acide acétique, eau (80:40:10:40).
- II. Pyridine, alcool isoamyllique, ammoniaque, eau (80:40:10:40).
- III. Pyridine, alcool isoamyllique, eau (80:40:70)
- IV. Butanol, acide acétique, eau (73:10:17)
- V. Butanol, acide acétique, eau (50:12:50), décanté.
- VI. Butanol, acide formique, eau (63:20:17).
- VII. Butanol, ammoniaque, eau (25:8:17), décanté.
- VIII. Phénol saturé d'eau.
- IX. Propanol, ammoniaque 20%, eau (73:20:7).
- X. Butanol, éthanol, acide acétique, eau (80:40:10:10).

Les résultats reportés sur la figure 1 illustrent le pouvoir séparateur de divers

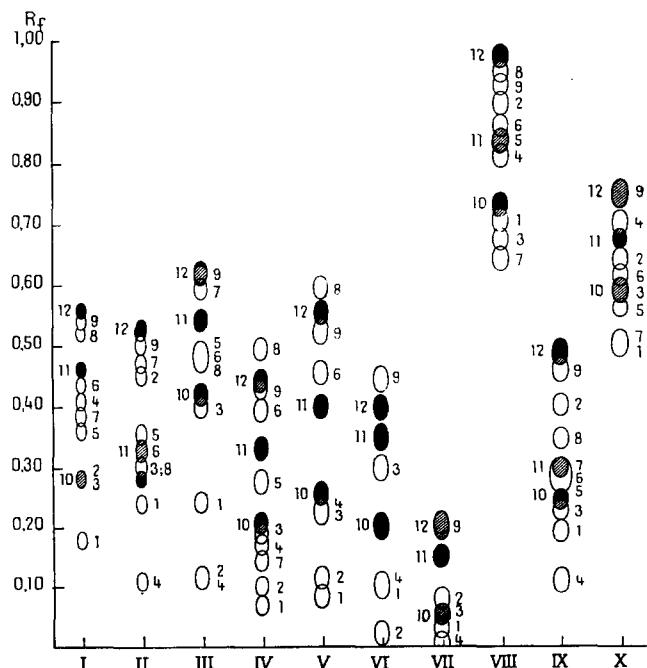


Fig. 1. Diagramme définissant les R_F des différents dérivés guanidiques obtenus en utilisant divers solvants (I à X), (chromatographie ascendante, à 20°, papier Whatman No. 1).

O Dérivés monosubstitués. 1. Arginine; 2. Agmatine; 3. Glycocyamine; 4. Arcaine; 5. Acide arginique; 6. Ac. Guanidopropionique; 7. Taurocyamine; 8. Acide Guanidobutyrique; 9. Monométhyl guanidine. ● Guanidine et dérivés disubstitués; 10. Créatine; 11. Guanidine; 12. Diméthylguanidine asym. ● Superposition de O et ●.

types de solvants, grâce auxquels on peut caractériser la plupart des dérivés guanidylés connus. Lorsque la séparation sur papier est faible, comme dans le cas de la créatine et de la glycocyamine, ou de la méthylguanidine et de la diméthylguanidine, la distinction entre ces corps est possible, les dérivés monosubstitués donnant la réaction de Sakaguchi et les autres ne réagissant qu'avec le diacétyle ou le mélange nitroprussiate-ferricyanure. Cependant les dérivés trisubstitués tels que l'astérubine, ne peuvent être décelés par aucune des méthodes décrites.

Application de la méthode à l'étude d'extraits d'origine biologique

Nous avons utilisé les méthodes décrites ci-dessus pour étudier les extraits de divers animaux marins, n'ayant pas fait l'objet d'études antérieures⁸.

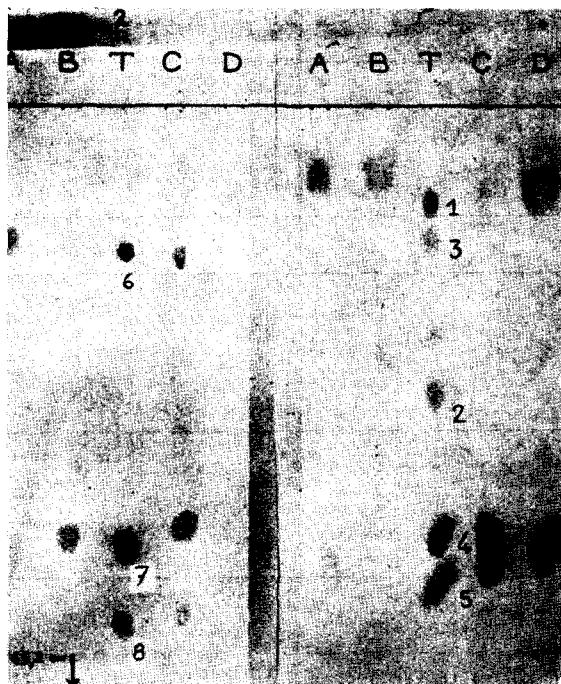


Fig. 2. Chromatogrammes des extraits d'Actinie (B), d'Alcyonnaire (C), d'Eponge (D), de Torpille (A). Chromatographie descendante à 20°, papier Whatman N° 1. Chromatogrammes obtenus en milieu butanolique (solvant IV) sur papier imprégné à la soude 0.2 N.

Des muscles de Torpilles (*Torpedo marmorata*, Risso), d'une Actinie (*Actinia equina* L.), un Alcyonnaire (*Alcyonium palmatum*, Pallas), une Eponge (*Hymeniacidon carencula*, Bow.) sont broyés avec deux à trois volumes d'eau. L'homogénéisat acidifié à l'aide d'acide acétique (pH 4) est porté au bain-marie bouillant 5 minutes et filtré. Le liquide clair est concentré sous vide et le résidu repris par l'alcool à 70° chaud; l'extrait alcoolique est concentré sous vide et la fraction du résidu soluble dans l'eau fournit la solution à analyser.

Les Figs. 2 et 3 illustrent les résultats obtenus. La Fig. 3 reproduit un chromatogramme obtenu en milieu pyridinique (solvant I) et la Fig. 2, un autre obtenu en milieu

butanolique (solvant IV) et sur papier imprégné à la soude 0.2 N¹. Sur chacun des clichés, la bande de gauche a été révélée au mélange diacétyle- α -naphtol et la bande de droite au réactif de SAKAGUCHI. Grâce à l'emploi de faibles concentrations en dérivés guanidiques, les taches correspondant à la guanidine (7), à la créatine (6) et à la diméthylguanidine (8) apparaissent seules au diacétyle. On peut ainsi conclure que les extraits de Torpille et d'Alcyonnaire renferment de la créatine et ceux d'Alcyonnaire, d'Actinie, de la guanidine associée dans les premiers seuls à la diméthylguanidine (Fig. 2, partie gauche). Le réactif α -naphtol-hypobromite permet de déceler dans les extraits étudiés la présence d'arginine (Torpille, Actinie, Alcyonnaire, Eponge) et de monométhylguanidine (Torpille, Alcyonnaire).

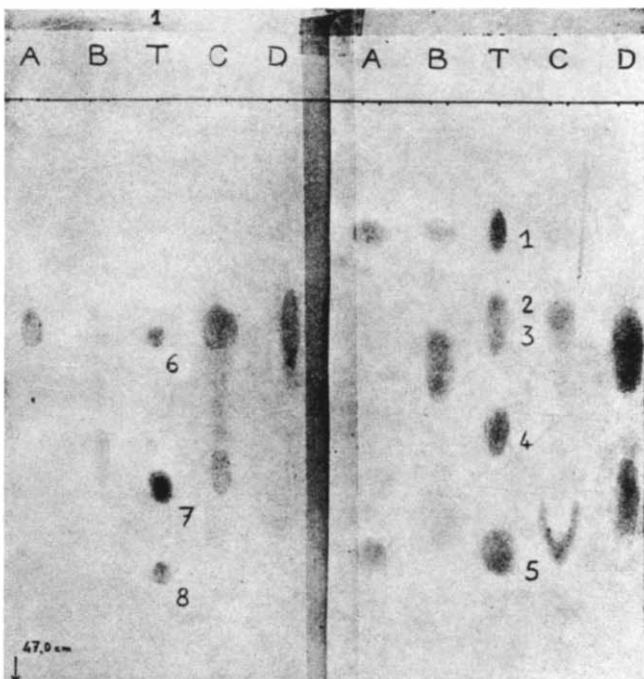


Fig. 3. Chromatogrammes des extraits d'Actinie (B), d'Alcyonnaire (C), d'Eponge (D), de Torpille (A). Chromatographie descendante à 20°, papier Whatman N° 1. Chromatogrammes obtenus en milieu pyridinique (solvant I).

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

La guanidine et différents dérivés mono- ou disubstitués examinés, en dehors de l'astérubine, peuvent être caractérisés, en utilisant la chromatographie sur papier avec révélation des chromatogrammes par coloration des taches au moyen de l'un des trois réactifs adoptés (α -naphtol-hypobromite, diacétyle- α -naphtol, nitroprussiate-ferri-cyanure). Le premier ne permet de mettre en évidence que les dérivés monosubstitués¹, les deux autres, la guanidine et les dérivés disubstitués. L'emploi du mélange diacétyle- α -naphtol peut être mis en oeuvre sur des chromatogrammes peu chargés en corps guanidiques pour n'y déceler que la guanidine et les dérivés disubstitués.

L'application de cette méthode d'analyse à l'étude des extraits d'Invertébrés marins

tels que des Actinies, des Alcyonnaires, des Eponges a permis d'observer la présence simultanée chez un Alcyonnaire, de l'arginine et de la créatine d'une part, de la guanidine et de la diméthylguanidine d'autre part. On ne sait encore lequel des deux premiers corps constitue l'accepteur de phosphates labiles dans ces organismes, ni si les deux derniers sont des produits de dégradation de l'arginine ou de la créatine.

RÉSUMÉ

1. La chromatographie sur papier et la révélation des chromatogrammes au moyen de trois types de réactifs (α -naphthol-hypobromite, α -naphthol-diacétyle, nitroprussiate-ferricyanure) a permis d'élaborer une méthode d'analyse de la guanidine et de ses dérivés mono- et disubstitués dans leurs mélanges.

2. L'application de cette méthode à l'étude d'extraits de tissus de divers Invertébrés a permis d'obtenir des informations, (citées à titre d'exemples) sur la nature des dérivés présents chez des Coelenterés et des Spongaires (guanidine, mono- et diméthylguanidine, créatine, arginine).

SUMMARY

1. Paper chromatography and the formation of chromatograms by means of three types of reagents (α -naphthol-hypobromite, α -naphthol-Diacetyl, Nitroprusside-Ferricyanide) has enabled the development of a method of analysis for guanidine and its mono- and di-substituted derivatives in their mixtures.

2. The application of this method to the study of tissue extracts from various invertebrates has provided information (cited as examples) on the nature of the guanidyl derivatives present in coelenterates and sponges (guanidine, mono- and di-methylguanidine, creatine, arginine).

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Papierchromatographie und die Entwicklung des Chromatogramms mit drei Reagenzien (α -Naphthol-Hypobromit, α -Naphthol-Diacetyl, Nitroprussid-Ferricyanid) erlaubte eine Analysenmethode für Guanidin und seine mono- und disubstituierten Derivate in ihren Mischungen herauszuarbeiten.

2. Die Anwendung dieser Methode zur Untersuchung der Gewebeextrakte von verschiedenen Invertebraten erlaubte Auskunft über die Natur der bei den Coelenteraten und Schwämme vorhandenen Guanidinderivate (Guanidin, Mono- und Dimethylguanidin, Kreatin, Arginin) zu erhalten.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. ROCHE, W. FELIX, Y. ROBIN ET N. V. THOAI, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1688.
- ² M. M. BARRITT, *J. Path. Bact.*, 42 (1936) 441.
- ³ R. H. MAJOR ET C. J. WEBER, *Arch. Intern. Med.*, 40 (1927) 891.
- ⁴ C. J. WEBER, *J. Biol. Chem.*, 78 (1928) 465.
- ⁵ J. E. ANDES ET V. C. MYERS, *J. Biol. Chem.*, 118 (1937) 137.
- ⁶ P. EGGLETON, S. R. ELSDEN ET N. GOUGH, *Biochem. J.*, 37 (1943) 526.
- ⁷ J. RAAFLAUB ET I. ABELIN, *Biochem. Z.*, 321 (1950) 158.
- ⁸ N. V. THOAI, J. ROCHE ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 403.

Reçu le 11 décembre 1953