

Séparation de la Riboflavine des sépiaptérines sur QAE-Sephadex A-25, échangeur d'Ions

La sépiaptérine et la riboflavine sont deux substances colorées en jaune possédant la même fluorescence jaunâtre, dont la séparation ne peut être obtenue en chromatographie sur papier que dans quelques systèmes de solvants seulement¹⁻³. Leur isolement devient délicat lorsque ces substances se trouvent dans un mélange naturel où leurs concentrations sont relativement faibles. Un fractionnement sur colonne doit être fait avec le minimum de pertes. La poudre de cellulose, développée avec l'un des solvants précédents, donne les meilleures résolutions. VISCONTINI¹ l'a utilisée pour isoler à l'état cristallin la sépiaptérine, l'isosépiaptérine et la riboflavine des mutants «sepia» de *D. melanogaster*. Les rechromatographies qui sont cependant nécessaires pour éliminer les sels contenus dans les solvants entraînent des pertes. Celles-ci peuvent devenir un obstacle à l'isolement — même de ces produits lorsque leurs quantités sont minimales.

Nous décrivons ici un fractionnement sur un gel de polydextrane substitué par des groupes diéthyl-2-hydroxypropyl: le QAE-Sephadex de degré de réticulation A-25. Ce support permet de séparer en une seule opération et sans introduction de sels les sépiaptérines à la fois de la riboflavine et de la plupart des autres ptérines qui sont le plus fréquemment rencontrées dans les organismes. La réunion des propriétés d'un tamis moléculaire et de celles d'un échangeur d'ions lui donne un pouvoir de résolution supérieur à celui de chacun des deux autres supports

susceptibles d'être utilisés pour cette séparation: le Sephadex G-10 (ou G-15) et la résine Dowex IX8⁴.

Pour déterminer les conditions optimales des séparations, nous avons fait varier le pH de l'effluent de la colonne et la hauteur du gel. Deux séries de fractionnements ont été faites: l'une avec un mélange connu de ptérines et de riboflavine, l'autre un «extrait brut» de mutants «sepia» de *D. melanogaster*.

Matériel et méthodes. 1. *Préparation des colonnes.* Le gel obtenu par gonflement dans l'eau déminéralisée a été mis sous forme formiate d'après la méthode de REMBOLD et BUSCHMANN⁴. Les effluents des colonnes ont été amenés à des valeurs de pH différentes, en lavant le gel par des volumes d'eau plus ou moins importants. Les développements ont été faits par de l'eau. La sortie des substances a été suivie par la mesure des densités optiques à 435 et 360 nm et l'identification en a été faite par les Rf et les produits de dégradation respectifs. 2. *Substances utilisées.* La sépiaptérine et l'isosépiaptérine ont été isolées à

¹ M. VISCONTINI et E. MOHLMANN, *Helv. chim. Acta* 42, 836 (1959).

² H. S. FORREST et H. K. MITCHELL, *J. Am. chem. Soc.* 76, 5656 (1954).

³ J. D. TAYLOR et G. J. PROKSCH, *J. Chromat.* 27, 509 (1967).

⁴ H. REMBOLD et E. BUSCHMANN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie*, 330, 132 (1962).

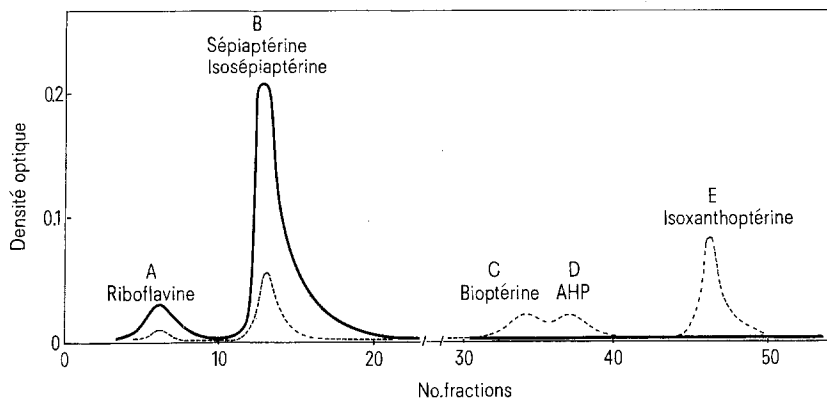


Fig. 1. Fractionnement d'un mélange de riboflavine, sépiaptérine, isosépiaptérine, biptérine, ptérine et d'isoxanthoptérine, sur une colonne de 2 cm de diamètre et de 70 cm de hauteur. Le pH de l'effluent est de 4,7. Volume moyen d'une fraction: 10 ml. Densités optiques —, à 435 nm; ---, à 360 nm.

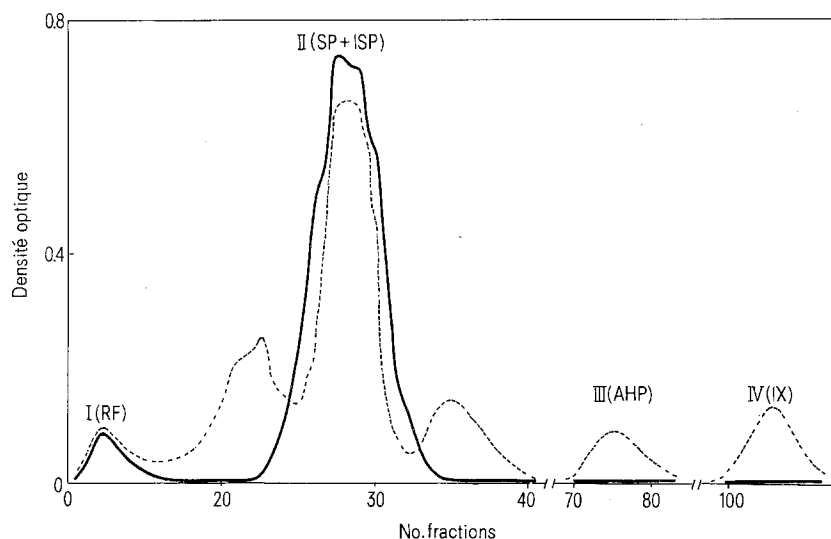


Fig. 2. Fractionnement de l'«extrait brut» des drosophiles «sepia». Colonne de 3,8 cm de diamètre et de 70 cm de hauteur; le pH de l'effluent est de 4,3. Volume approximatif d'une fraction: 20 ml. Densités optiques —, à 435 nm; ---, à 350 nm.

partir des drosophiles «sepias»⁵, de la façon suivante: extraction par macération dans l'éthanol à 70%, élimination de l'alcool, centrifugation du résidu, adsorption des substances fluorescentes sur Florisil 60–100 mesh à pH 4, élution à l'acétone à 30%. Séparation des sépiaptérines de la riboflavine sur QAE-Sephadex A-25. Isolement des premières sur papier Whatman No 1 dans le butanol-acide acétique-eau (4/1/1), puis l'eau. Les autres substances sont des préparations commerciales: ptérine et isoxanthoptérine (Fluka), biptérine (Smith, Kline & French) et riboflavine (Calbiochem). L'«extrait brut» est l'extrait précédent avant son passage sur Florisil.

Résultats. Les meilleurs séparations ont été obtenues à des pH voisins de 4,5–5,0; des valeurs plus faibles diminuent la résolution des ptérines entre elles sans affecter notablement celle de la riboflavine et des sépiaptérines; des valeurs plus élevées ont un effet contraire. La figure 1 représente un fractionnement sur une colonne de 2 cm de diamètre et de 70 cm de hauteur, à pH 4,7. Le premier pic (A) correspond à la riboflavine, le second (B) aux sépiaptérines qui ne sont pas séparées, les suivants aux trois autres ptérines.

Le fractionnement de l'«extrait brut» effectué à pH 4,3 sur une colonne de 3,8 cm de diamètre et de 70 cm de hauteur, a donné des résultats analogues aux précédents (Figure 2). Il en a été de même avec des colonnes plus étroites (0,8 cm).

Pour divers diamètres de colonnes, la séparation sépiaptérines-riboflavine se fait dès les 50 premiers centimètres, mais 70 cm sont nécessaires pour qu'elle soit complète. Les pertes subies pendant le fractionnement sont différentes suivant les substances: les rendements ont été respectivement de 66 et 89% pour la sépiaptérine et la

riboflavine, dans le cas de deux colonnes (diamètre 1,2 cm, hauteur 70 cm), chacune chargée avec 30 µg de l'une des deux substances. Les résultats de ces fractionnements ont été comparés à ceux donnés par le QAE-Sephadex A-50 de degré de réticulation plus faible et le DEAE-Sephadex A-25 échangeur d'anions faibles. Dans les deux cas, les résolutions de tous les pics sont été bien moins prononcées.

Conclusion. Le QAE-Sephadex se comporte comme un tamis moléculaire vis-à-vis de la riboflavine et des sépiaptérines dont les charges sont voisines, mais un échangeur d'ions vis-à-vis de l'ensemble des ptérines. Il possède un pouvoir de résolution prononcé. Les sépiaptérines, sans être séparées entre elles, sont isolées de la riboflavine comme de plusieurs autres ptérines de charges voisines (la migration des drosoptérines – labiles – se fait avec destruction dans la colonne). Il convient aussi bien pour de faibles que de fortes quantités de substances et complète les données fournies par la poudre de cellulose.

Summary. Sepiapterins are easily separated from riboflavin and other weakly charged pterins, on QAE-Sephadex A-25.

A. MOMZIKOFF

Institut Océanographique, Laboratoire de Physiologie des êtres marins, 195, rue Saint-Jacques, F-75005 Paris (France), 14 juin 1973.

⁵ Nous remercions M. ANXOLABEHÈRE, du Laboratoire de Mme le Professeur PETIT, de la Faculté des Sciences de Paris, pour les souches qu'il nous a fournies.

Preparation of Carbohydrate Modified Proteins

Mono- and oligosaccharides may be attached to protein molecules by diazo-coupling of the *p*-aminophenol glycosides, mainly by reaction with the tyrosine residues occurring in the proteins¹. However this type of linkage has not yet been found in nature, and the presence of aromatic rings near the carbohydrate-protein bond may influence the immunological properties of the product.

We can now describe a method which enables glycosylamines to be attached to the carbodiimide activated carboxyl groups of the proteins². In this series of experiments we used egg white lysozyme (Sigma, 3 × crystallized) as protein component, and α-D-galactosylamine NH₃-complex³, lactosylamine⁴ as well as D-glucosamine as sugar derivatives.

The reaction mixture contained 10 mg of lysozyme and 1.0 mmol of glycosylamine or glucosamine, dissolved in

8 M aqueous urea (1 ml) or 5 M guanidine HCl (1 ml). 20 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (OTT chemical Co.) dissolved in 0.5 ml urea (8 M) or guanidine HCl (5 M) was then added, at room temperature to initiate the reaction. The pH was maintained at 4.75 by automatic titration in a Radiometer pH-stat with 4.0 M HCl. 20 min after the end of the acid uptake (35–40 min) the solution was dialyzed against 3 changes of 0.001 M

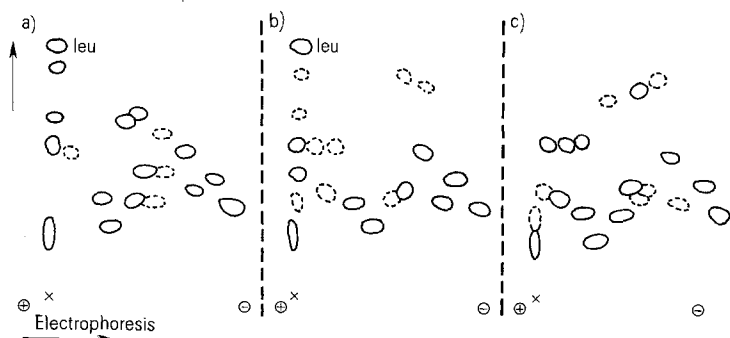


Fig. 1. Peptide map of a trypsin digest of reduced, carboxymethylated lysozyme and its glycosylated derivatives on silica thin layers. Peptides detected by ninhydrine. Electrophoretic step: pyridine-acetic acid-water 1:10:89, 2 h, 300 V; chromatography: isoamylalcohol-pyridine-water 7:8:6. Leu = leucine. a) lysozyme. b) galactosylamine. c) lactosylamine derivative.

¹ A. M. STAUB, S. STIRM, L. LE MINOR, O. LUDERITZ and O. WESTPHAL, *Ann. Inst. Pasteur* 111, 47 (1966).

² D. G. HOARE and D. E. KOSHLAND JR., *J. biol. Chem.* 242, 2447 (1967).

³ H. L. FRUSH and H. S. ISBELL, *Bur. Stand. J. Res.* 47, 239 (1951).

⁴ F. MICHEEL, R. FRIER, E. PLATE and A. HILLER, *Chem. Ber.* 85, 1092 (1952).