

LA RENAISSANCE DE LA MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE DE M. TSWETT EN 1931*

EDGAR LEDERER

*Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette et Institut de Biochimie,
Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91-Orsay (France)*

(Reçu le 18 avril 1972)

Depuis la publication en 1910 du livre de TSWETT *Les chromatophylles dans le monde végétal et animal*¹ très peu de chimistes avaient utilisé sa méthode. Elle est restée longtemps peu connue, car TSWETT lui-même et après lui DHÉRÉ ET VEGEZZI² (1916), PALMER ET ECKLES³ (1913), COWARD⁴ (1924) et d'autres l'avaient employée seulement pour séparer de très petites quantités de pigments en solution, pour des études spectrographiques. WILLSTÄTTER^{**} ET STOLL⁵ avaient même émis des doutes sur la valeur préparative de la chromatographie après avoir utilisé un adsorbant inadéquat pour purifier des chlorophylles. Pourtant TSWETT¹ avait déjà constaté que ces pigments étaient détruits par des adsorbants trop "agressifs" et avait recommandé l'usage du sucre en poudre ou de l'inuline, ce qui apparemment avait échappé à WILLSTÄTTER ET STOLL.

En arrivant à Heidelberg en septembre 1930 pour un stage de recherches post-doctorales au laboratoire de chimie du Kaiser Wilhelm Institut für Medizinische Forschung, dirigé par le très jeune professeur RICHARD KUHN^{***}, j'ai commencé à participer à un travail sur les caroténoïdes, entrepris par un assistant, A. WINTERSTEIN[§].

A ce moment peu de ces pigments naturels avaient été isolés à l'état pur, mais KUHN ET WINTERSTEIN[§] avaient contribué au développement de leur chimie par leurs travaux sur les diphényl-polyènes synthétiques.

En fait, on connaissait surtout deux hydrocarbures $C_{40}H_{56}$, le carotène de la carotte, isolé à l'état cristallisé par WACKENRÖDER⁷ en 1831 et le lycopène de la tomate décrit par WILLSTÄTTER ET ESCHER⁸ en 1911. WILLSTÄTTER ET MIEG⁹ avaient d'autre part établi la formule brute $C_{40}H_{56}O_2$ pour différentes préparations de caroténoïdes hydroxylés dont la xanthophylle de feuilles vertes et la lutéine du jaune d'oeuf de poule ; KARRER et coll.¹⁰ venaient d'isoler du maïs jaune un nouvel isomère, la zéaxanthine.

La situation dans ce domaine était loin d'être claire ; un coup d'œil sur le Tableau I suffit pour se convaincre que la rotation des préparations de xanthophylles

* Une représentation russe de cet article a été publié dans un volume avec le titre "Osnovki Chromatografii", dédié à le centième anniversaire de M. S. Tswett, Academy of Sciences of U.S.S.R., mai 1972.

** Né à Karlsruhe en 1872, Prix Nobel de chimie en 1915, mort à Locarno en 1942.

*** Né à Vienne en 1900, Prix Nobel de chimie en 1938, mort à Heidelberg en 1967.

§ Né à Zurich en 1897, mort à Tokyo en 1960.

décrivées jusqu'à ce jour par différents auteurs variait de $+136^\circ$ à $+192^\circ$; la zéaxanthine avait des propriétés nettement différentes, le point de fusion le plus élevé et une rotation négative; la lutéine avait des propriétés intermédiaires.

TABLEAU 1

POINTS DE FUSION ET ROTATIONS DES CAROTÉNOÏDES $C_{40}H_{56}O_2$ CONNUS AVANT LE TRAVAIL DE KUHN ET COLL.¹¹

	F	$[\alpha]_{CD}$
Xanthophylle de feuilles vertes	$173-174^\circ$	$+136-192^\circ$
Lutéine de jaune d'oeuf	$195-196^\circ$	$+72^\circ$
Zéaxanthine	$201-202^\circ$	-70°

Mais quelle était la différence chimique entre la lutéine de jaune d'oeuf et la xanthophylle des feuilles?

Mon travail consistait d'abord à isoler des xanthophylles de diverses sources et à les comparer avec la lutéine qu'il fallait préparer à partir du jaune de centaines d'oeufs*.

Le Tableau 2 montre qu'indépendamment de la source végétale nous obtenions des préparations ayant un point de fusion de 193° et un $[\alpha]_{CD}$ de $+145^\circ$ **. Quant à la lutéine de jaune d'oeuf elle avait un point de fusion légèrement supérieur et une rotation nettement inférieure.

TABLEAU 2

PRÉPARATIONS DE XANTHOPHYLLES DE FEUILLES VERTES ET DE FLEURS JAUNES (D'APRÈS KUHN ET COLL.¹¹)

Source	F	$[\alpha]_{CD}$ (dans l'acétate d'éthyle)
Feuilles de		
chataignier (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	$191-191.5^\circ$	$+144^\circ$
ortie (<i>Urtica dioica</i>)	$191-191.5^\circ$	$+140^\circ$
trèfle (<i>Trifolium pratense</i>)	$190.5-191^\circ$	$+152^\circ$
maïs jaune (<i>Zea mays</i>)	$192.5-193^\circ$	$+140^\circ$
luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	$192-192.5^\circ$	$+143^\circ$
épinards (<i>Spinacia glabra</i>)	$191.5-192^\circ$	$+141^\circ$
gazon	$192.5-193^\circ$	$+138^\circ$
Pétales de		
<i>Tagetes grandiflora</i>	$192-192.5^\circ$	$+144^\circ$
<i>Helenium autumnale</i>	$191.5-192^\circ$	$+145^\circ$
<i>Rudbeckia neumannii</i>	$192.5-193^\circ$	$+141^\circ$
<i>Helianthus annuus</i>	$192.5-193^\circ$	$+141^\circ$

C'est alors que KUHN émit l'hypothèse que la lutéine du jaune d'oeuf pouvait être un mélange de la xanthophylle des feuilles et de zéaxanthine. Mais comment tester

* Le blanc d'oeuf a été transformé en délicieux macarons.

** Prévoyant que la mesure de la rotation optique des caroténoïdes serait utile pour distinguer les divers pigments, KUHN avait installé dans son laboratoire un polarimètre doté d'une lampe à cadmium, qui grâce à sa forte raie rouge $Cd_{645.5}$ permettait de mesurer avec assez de précision la rotation optique des solutions jaunes, oranges ou rouges des caroténoïdes.

cette hypothèse? Le livre de PALMER *Carotenoids and Related Pigments*¹² que je lus à cette époque mentionnait la méthode de TSWETT et les quelques applications que des biologistes en avaient faites. J'en parlais à KUHN, qui par bonheur possédait une traduction allemande, manuscrite, du livre de TSWETT¹ que WILLSTÄTTER avait fait faire. C'est dans ce manuscrit que j'ai pu lire tous les détails nécessaires.

Donc par un beau jour de décembre 1930 je préparais une colonne de carbonate de calcium pulvérisé et versais dessus une solution d'un mélange de 0,5 mg de lutéine et 0,5 mg de zéaxanthine dans le sulfure de carbone*; après un lavage abondant de la colonne avec le même solvant, elle présentait une large bande orange dont la teinte était nettement différente en haut et en bas (Fig. 1). Avec une spatule la couche supérieure fut enlevée, une couche intermédiaire mise de côté et la couche inférieure sortie de la colonne.

Après suspension de l'adsorbant dans du méthanol tout le pigment adsorbé fut élué et après filtration l'eluat de la zone 1 présentait le spectre d'absorption de la lutéine ($\lambda_{\text{max.}}$ à 508 et 475 nm dans CS_2) tandis que l'eluat de la zone inférieure avait le spectre de la zéaxanthine ($\lambda_{\text{max.}}$ 517 et 483 nm dans CS_2). La séparation était donc possible.

Vint ensuite l'expérience cruciale : 30 mg de lutéine isolée de jaune d'oeuf ($[\alpha]_{\text{CD}} = +100^\circ$, CHCl_3) furent adsorbés sur une colonne de 7 cm de diamètre. Après développement, la zone supérieure et la zone inférieure furent éluées, la zone intermédiaire rechromatographiée et de nouveau les zones supérieures et inférieures prélevées. Après une troisième chromatographie les éluats de la zone supérieure donnaient des cristaux avec $[\alpha]_{\text{CD}} = +145^\circ$ correspondant à la rotation des xanthophylles des feuilles; l'eluat des zones inférieures qui présentait le spectre de la zéaxanthine était optiquement inactif (donc encore impur).

En Fig. 1 on trouvera la description originale de ces expériences.

La lutéine de jaune d'oeuf de poule était donc un mélange de pigments des feuilles et du maïs et apparemment dépendant de la nourriture (ce qui fut confirmé par des expériences de BROCKMANN dans le laboratoire de KUHN).

C'est alors qu'en accord avec WILLSTÄTTER la nomenclature suivante fut proposée: le nom de *xanthophylle* désignerait tous les caroténoïdes oxygénés en C_{40} tandis que le nom de *lutéine* serait réservé au pigment $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$, $F = 193^\circ$, $[\alpha]_{\text{CD}} = +145^\circ$ qui est le constituant majeur des xanthophylles des feuilles. Cette nomenclature a été ultérieurement approuvée par une Commission internationale de Nomenclature de l'IUPAC.

Entre temps j'avais poursuivi une étude sur le carotène de la carotte. KARRER et coll.¹³ venaient de publier leur formule, résultat d'un travail expérimental délicat et d'intuition géniale. Cette formule ne contient pas de carbone asymétrique.

Or, en mesurant le pouvoir rotatoire du carotène de la carotte avec le polarimètre à lampe de cadmium, je constatais que toutes les préparations étaient plus ou moins dextrogyres (de $[\alpha]_{\text{CD}} = +15^\circ$ à $+60^\circ$); on pouvait soupçonner la présence d'impuretés dextrogyres ou l'inexactitude de la formule de KARRER et coll.¹³. Cette question était d'autant plus importante que EULER et coll.¹⁴ venaient de montrer (en 1928) que le carotène agissait comme provitamine A chez les rats carencés en vitamine A.

* Solvant très peu approprié d'ailleurs!

KUHN, WINTERSTEIN UND LEDERER, Zur Kenntnis der Xanthophylle.
(*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 197 (1931) 158.)

12. Zerlegung des Dotterfarbstoffes in seine Komponenten.

(a) Fraktionierung eines künstlichen Gemisches von Lutein und Zeaxanthin. 0.5 mg Lutein und 0.5 mg Zeaxanthin wurden in 10 cc Schwefelkohlenstoff gelöst. Diese Lösung saugten wir langsam durch ein mit Calciumcarbonat (gefällt, E. Merck) gefülltes Rohr von 15 cm Länge und 10 mm lichter Weite, das unten durch einen Wattebausch abgeschlossen war. Durch Nachwaschen mit Schwefelkohlenstoff (insgesamt 20-30 cc) gelang es, die Adsorptionsschichten mehrere Zentimeter auseinander zu ziehen. Das erhaltene Chromatogramm ist in der Figur dargestellt. Die Schichten 1-4 wurden getrennt herausgenommen und mit Methanol eluiert. Nach dem Filtrieren und Verdampfen fanden wir in Schwefelkohlenstoff folgende Absorptionsbanden:

1. Schicht: 508	476	3. Schicht: 513	481
2. Schicht: 509	477	4. Schicht: 516	483
Lutein: 508	475	Zeaxanthin: 517	483

In den Schichten 1 und 4 waren je 10-15% des gesamten Farbstoffes vorhanden.

(b) Fraktionierung des Xanthophyllpräparates aus bulgarischen Hühnereiern (Spektrum: 509.5, 476 $\mu\mu$). Adsorption und Elution wurden wie bei dem künstlichen Farbstoffgemisch ausgeführt.

1. Schicht: 507.5	476	3. Schicht: 510	477
2. Schicht: 510	477	4. Schicht: 512	478

(c) Fraktionierung eines Xanthophyllpräparates aus holländischen Hühnereiern (Spektrum: 509, 476 $\mu\mu$).

1. Schicht: 507.5	477	3. Schicht: 510.5	478.5
2. Schicht: 509.5	477	4. Schicht: 514	480.5

In etwas grösserem Massstab wurde ein Präparat aus bulgarischen Eidottern von $[\alpha]_{CD}^{20} = +100^\circ$ (Chloroform) fraktioniert. Für 30 mg Farbstoff, die in 500 cc Schwefelkohlenstoff gelöst waren, verwendeten wir ein Adsorptionsrohr von 7 cm Durchmesser. Die Lutein- und Zeaxanthinzone wurden 5 cm auseinandergezogen, die mittleren Schichten eluiert, an frischem Calciumcarbonat adsorbiert. Die Mittelschichten des zweiten Rohres wurden wieder eluiert und der darin enthaltene Farbstoff ein drittes Mal durch ein Calciumcarbonat-Rohr geschickt.

Die vereinigten Schichten 1 und die vereinigten Schichten 4 enthielten etwa je 10% des angewandten Farbstoffes. Nach dem Eluieren mit Methanol und Überführen in Schwefelkohlenstoff fanden wir:

Schichten 1: 508 476 Schichten 4: 513.5 479 $\mu\mu$

Die Luteinfraktion (1) zeigte nach dem Umkristallisieren

$$[\alpha]_{CD}^{18} = (+0.16^\circ \cdot 100) : (0.022 \cdot 0.5) = +145^\circ \text{ (Chloroform),}$$

was einem Luteingehalt von etwa 90% entspricht.

Die Zeaxanthinfraktion (4) war kaum optisch aktiv. Sie schmolz in noch unreinem Zustande bei 195-196° (korrig.).

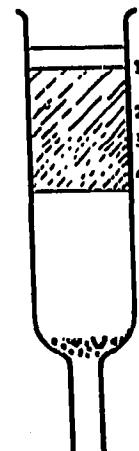


Fig. I.

J'essayais alors de purifier le carotène par une réaction décrite par WILLSTÄTTER ET ESCHER⁸: L'addition d'une solution d'iode à une solution de carotène donne un précipité noir d'iodures de carotène. Le précipité fut bien obtenu, mais après enlèvement de l'iode par le thiosulfate un autre pigment fut obtenu, plus foncé que le carotène, que nous avons appelé isocarotène^{15,16,*}.

* KARRER ET SCHWAB¹⁷ ont montré plus tard qu'il s'agit en fait d'un déhydrocarotène.

L'eau-mère du précipité d'iodure fut également désiodée et la solution orange ainsi obtenue gardée "pour toute éventualité". Après quelques jours, de beaux cristaux s'étaient formés qui après recristallisation donnaient un nouveau pigment, $C_{40}H_{56}F = 173^\circ$ avec un $[\alpha]_{CD}$ de $+380^\circ$! Le carotène α était ainsi découvert; c'est lui qui évidemment était la cause de la dextrorotation du carotène brut de la carotte^{15,18}.

Il était facile de montrer ensuite que la chromatographie sur alumine et surtout sur une alumine particulière la "Fasertonerde" de Wislicenus pouvait séparer les deux carotènes isomères α et β . TSWETT¹ avait déjà écrit: "Il est très probable que le carotène des feuilles n'est pas un individu unique, mais un mélange de deux ou de plusieurs homologues que l'on pourrait séparer par la méthode de l'adsorption, en utilisant des adsorbants adéquats."

Une étude détaillée de différentes sources de carotène a montré que le carotène optiquement inactif que nous avons proposé d'appeler carotène β se trouvait à l'état pratiquement pur dans les feuilles d'épinards, d'orties etc.¹⁹.

La première publication mentionnant l'utilisation préparative de la chromatographie est datée du 17 février 1931 et fut envoyée aux *Naturwissenschaften* sous le titre "Fraktionierung und Isomerisierung des Karotins". C'est une Note brève qui mentionne la chromatographie seulement par la phrase "Durch fraktionierte Adsorption oder fraktionierte Fällung mit Jod gelingt es, etc."¹⁸.

Les détails expérimentaux concernant ces séparations sont consignés en un mémoire intitulé "Über das Vitamin des Wachstums. I. Mitteilung. Zerlegung des Karotins in seine Komponenten" qui fut envoyé un mois après, le 18 mars 1931, aux *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*¹⁸.

C'est le 10 mars 1931 que fut envoyé au *Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* un mémoire intitulé "Zur Kenntnis der Xanthophylle" et contenant la description de la séparation préparative de la lutéine et de la zéaxanthine¹¹ (voir Fig. 1).

Quelques mois plus tard j'ai voulu isoler les pigments jaunes des fleurs de pisserlit, récoltés sur la prairie devant l'Institut.

Cette fois-ci la chromatographie sur carbonate de calcium fournit d'emblée deux zones distinctes l'une contenant la lutéine $C_{40}H_{56}O_2$ bien connue, l'autre un nouveau pigment, la taraxanthine²⁰, que nous pensions correspondre à la formule brute $C_{40}H_{56}O_4$.

La valeur analytique et préparative de la méthode de TSWETT était ainsi démontrée de façon assez spectaculaire et plusieurs autres chercheurs du laboratoire de KUHN notamment BROCKMANN²² et WINTERSTEIN²³⁻²⁵ se mirent rapidement à en étudier les applications. Les laboratoires de KARRER²⁶ à Zurich et celui de ZECHMEISTER^{27,28} à Pecs (Hongrie) en furent ensuite les plus fervents adeptes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. TSWETT, *Les chromophylles dans le monde végétal et animal*, Varsovie, 1910.
- 2 C. DHÉRÉ ET N. VEGEZI, *Compt. Rend.*, (1916) 399; (1917) 986; *J. Physiol. Pathol. Gen.*, 44 (1917) 53.
- 3 L. S. PALMER ET N. ECKLES, *J. Biol. Chem.*, 17 (1914) 191, 211, 223, 237, 245.
- 4 H. F. COWARD, *Biochem. J.*, 18 (1924) 1114.
- 5 R. WILLSTÄTTER ET A. STOLL, *Untersuchungen über Chlorophyll*, Springer, Berlin, 1913.

* EGGER²¹ a montré récemment qu'il s'agit en fait de l'époxyde de lutéine $C_{40}H_{56}O_3$.

- 6 R. KUHN ET A. WINTERSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 11 (1928) 87, 116, 123, 144.
- 7 H. WACKENRÖDER, *Geigers Mag. Pharm.*, 33 (1831) 144.
- 8 R. WILLSTÄTTER ET H. H. ESCHER, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 76 (1911) 214.
- 9 R. WILLSTÄTTER ET W. MIEG, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 355 (1907) 1.
- 10 P. KARRER, H. SALOMON ET H. WEHRLI, *Helv. Chim. Acta*, 12 (1929) 790.
- 11 R. KUHN, A. WINTERSTEIN ET E. LEDERER, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 197 (1931) 141.
- 12 L. S. PALMER, *Carotenoids and Related Pigments*, The Chemical Catalog Co., New York, 1922.
- 13 P. KARRER, A. HELFENSTEIN, H. WEHRLI ET A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 13 (1930) 1084.
- 14 B. V. EULER, H. V. EULER ET H. HELLSTRÖM, *Biochem. Z.*, 203 (1928) 370.
- 15 R. KUHN ET E. LEDERER, *Naturwissenschaften*, 19 (1931) 306.
- 16 R. KUHN ET E. LEDERER, *Chem. Ber.*, 65 (1932) 637.
- 17 P. KARRER ET G. SCHWAB, *Helv. Chim. Acta*, 23 (1940) 578.
- 18 R. KUHN ET E. LEDERER, *Chem. Ber.*, 64 (1931) 1349.
- 19 R. KUHN ET E. LEDERER, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 200 (1931) 246.
- 20 R. KUHN ET E. LEDERER, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 200 (1931) 108.
- 21 K. EGGER, *Planta*, 80 (1968) 65.
- 22 R. KUHN ET H. BROCKMANN, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 206 (1932) 41; *Chem. Ber.*, 66 (1933) 407.
- 23 A. WINTERSTEIN ET G. STEIN, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 220 (1933) 247, 263.
- 24 A. WINTERSTEIN ET K. SCHÖN, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 230 (1934) 139, 146, 158.
- 25 A. WINTERSTEIN ET H. VETTER, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 230 (1934) 169.
- 26 P. KARRER ET K. SCHÖPF, *Helv. Chim. Acta*, 15 (1932) 745; 17 (1934) 693.
- 27 L. ZECHMEISTER ET L. CHOLNOKY, *Monatsh. Chem.*, 68 (1936) 68.
- 28 L. ZECHMEISTER ET L. CHOLNOKY, *Die chromatographische Adsorptionsmethode*, Springer, Wien, 1937.

J. Chromatogr., 73 (1972) 361-366