

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Departamento de Bioquímica  
Madrid. (España)

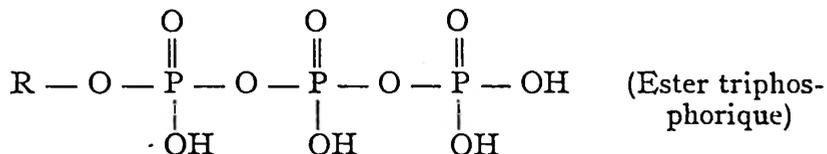
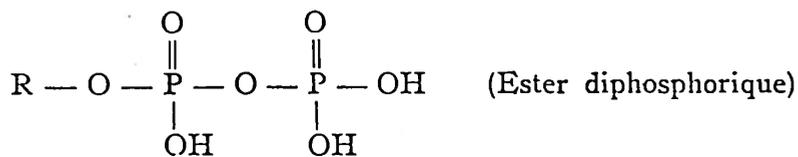
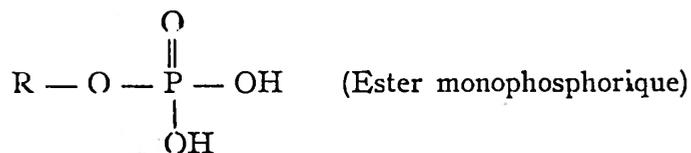
## La séparation chromatographique des esters phosphoriques de la thiamine et ses applications \*

Gertrudis de la Fuente, R. Díaz Cadavieco et A. Santos Ruiz

(Recibido para publicar el 8 de septiembre de 1955)

### Introduction

Dans ce mémoire, il s'agit exclusivement des produits d'estérification de la chaîne alcoolique de la thiamine, et particulièrement des esters :



\* Este trabajo constituye la nota VI de la serie *Estudios sobre carboxilasas*, que viene publicándose en esta Revista.

où R est la molécule de la thiamine sous la forme du chlorure ou phosphate, selon l'ion qui s'attache au nitrogène quaternaire.

Lohmann et Schuster (1) ont isolé l'ester diphosphorique (cocarboxylase) de la levure de brasserie, et ils ont étudié ses propriétés, ainsi que l'ester monophosphorique, préparé par l'hydrolyse, au milieu acide, de l'ester diphosphorique.

Dans plusieurs rapports publiés depuis l'année 1937, sont décrites des méthodes pour la synthèse de la cocarboxylase, par phosphorylation directe de la thiamine, l'agent phosphorylante étant un mélange de l'acide o-phosphorique et du pyrophosphate de sodium, préalablement chauffés à haute température.

Tauber (2), Weijlard (3), Weijlard et Tauber (4), Weil-Malherbe (5), Karrer et Viscontini (6, 7), ont rapporté des diverses méthodes qui ne se différencient pas dans la synthèse elle-même, mais dans la subséquent purification. Pour l'isolement de la cocarboxylase est utilisée la différence en solubilité qu'il y a entre l'ester diphosphorique et l'ester monophosphorique d'une part et la thiamine non phosphorylée d'autre part. Stern (8) utilise POC 1, pour la phosphorylation, mais il obtient plus bas rendement.

Les faits qu'ont permis aux auteurs des méthodes d'affirmer que les produits obtenus étaient vraiment cocarboxylases furent : l'analyse élémentaire et les preuves d'activité co-carboxylasique. Ces derniers sont basés sur le fait que, par un lavage approprié, on peut priver la levure de son contenu en cocarboxylase naturel et, inversement, par l'addition de l'ester diphosphorique de la thiamine, lui rendre la propriété de décarboxyler l'acide pyruvique. L'intensité de la décarboxylation peut être évaluée soit par le dosage du CO<sub>2</sub> dégagé, soit par le dosage de l'acétaldéhyde.

L'ester triphosphorique de la thiamine, décrit par Velluz et ses col. (9), possède un grand intérêt biologique en raison de ses effets sur le muscle cardiaque et son possible rôle comme porteur de groupements phosphoriques Velluz et ses col. (9), Karrer et Viscontini (6) et Viscontini et ses col. (7), ont rapporté des méthodes pour la synthèse de cet ester ; dans tous eux, la synthèse consiste à mettre en contact l'aneurine (phosphate) et un excès d'acide phosphorique, préalablement chauffé jusqu'à troublement ; dans ces conditions sont formées chaînes polyphosphoriques qui, par subséquent hydrolyse libèrent de l'acide phosphorique, en devenant en esters de chaîne plus courte et finalement, en l'ester monophosphorique.

La purification, selon les auteurs, est accompli par précipitation à 0° avec un mélange d'acétone et alcool absolu. Comme Velluz et ses col. ont précisé (10), le produit de telles phospho-

rylations est un mélange complexe et peu connu de proosphates, difficilement séparables avec tendance à constituer des précipités gommeux ou de l'huile, qui ne cristallisent qu'après plusieurs réprécipitations.

Il convient de signaler, en outre, que l'analyse élémentaire n'a point d'intérêt pour la caractérisation du produit, puisque, comme on le sait, la somme d'une molécule d'ester triphosphorique et une autre d'ester monophosphorique donne la même composition centésimale que deux molécules d'ester diphosphorique.

L'ester triphosphorique ainsi préparé, a été soumis à preuves pour déterminer s'il possède de l'activité cocarboxylasique (6, 7, 9, 11, 12) ; ces auteurs coïncident en lui assigner une certaine activité bien que les chiffres données par eux sont différentes.

C'est grâce à la chromatographie sur papier que ces esters ont été parfaitement séparés. Cet article présente les résultats obtenus en appliquant la technique chromatographique, combinée avec la micro-dosage du phosphore labile et total, aux produits synthétisés, aussi préparés à notre laboratoire par différentes méthodes, comme à des échantillons provenant du commerce ; dans les dernières années, l'application thérapeutique de la cocarboxylase est devenu de plus en plus importante : par ce raison, nous avons jugé intéressant connaître la composition des produits qu'on trouve au commerce sous la dénomination de cocarboxylase pure.

## Partie expérimentale

### MATÉRIELS

Acide o-phosphorique, pyrophosphate de sodium et anhydride phosphorique Merck.

Acide meta-phosphorique Mallinckrodt.

Cocarboxylases commerciales provenant de divers Laboratoires européens et américains.

### MODE OPÉRATOIRE

La synthèse de la cocarboxylase a été faite selon la méthode de Weijlard et Tauber sans modifications (4).

L'ester monophosphorique a été obtenu très bien cristallisé, en grosses aiguilles, des eaux mères de la cristallisation de la

cocarboxylase, laissées pendant plusieurs jours au réfrigérateur (environ 5° C).

L'ester triphosphorique a été préparé par quatre méthodes :

*Méthode n.° 1.*— Celle-là décrite par Velluz, Amiard et Bartos avec du phosphate de thiamine (9), sans modification. Le produit obtenu fut désigné avec le n.° 1.

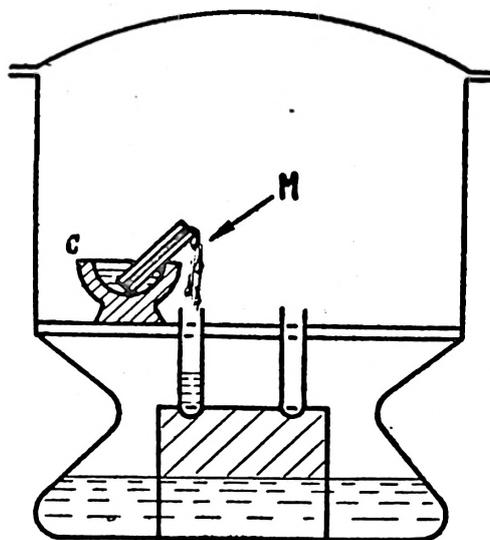


Fig. 1

*Méthode n.° 2.*— Le même n.° 1, avec les modifications suivantes : la proportion de l'acide phosphorique fut doublée, le temps de chauffage fut réduit à 15 minutes, mais la température élevée à 160° C. Le traitement avec l'alcool-acétone fut répété trois fois à 0°. Chaque addition d'alcool-acétone fut suivi d'énergique agitation, trituration et grattage, en employant une heure dans cette opération. La poudre cristalline obtenue fut filtrée sous vide et mis en dessécheur à 0° pendant 2 jours. Le produit ainsi obtenu est moins hygroscopique que celui-là provenant de la méthode n.° 1. Il fut désigné avec le n.° 2.

*Méthode n.° 3.*— 2 cm.<sup>3</sup> de PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> 85 per 100 furent chauffés jusqu'à troublement ; alors on ajouta 0'5 g. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Après dissolution, et refroidissement jusqu'à 150°, il fut mis dans bain d'huile et fut ajouté 1 g. de thiamine (chlorure) et chauffé à 160-161° pendant 20 minutes. Le reste comme les méthodes antérieures. C'est le n.° 3.

*Méthode n.° 4.*— 2 cm.<sup>3</sup> de PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> ; 85 per 100 furent chauffées jusqu'à troublement et alors, furent ajoutés 0'5 g. de l'acide metaphosphorique et 0'5 g. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Après homogénéiser et refroidir, on ajoute 1 g. de thiamine dans la même façon que l'antérieur. Le chauffage fut de 15 minutes a 120° et le reste comme l'antérieur. Le produit fut désigné avec le n.° 4.

La chromatographie fut réalisée par une des techniques décrites par Siliprandi (12) dont les principaux caractères sont les suivants :

Papier Whatman n.° 1, lavé une fois à l'acide chlorhydrique 4n, une fois avec solution saturée de 8 oxiquinoline à l'alcool 50 per 100 et, finalement, plusieurs fois avec de l'alcool 50 per 100 jusqu'à totale disparition du couleur dû à l'oxiquinoline.

Chaque pièce de papier, 50 cm. en longueur et 6 cm. en largeur, portait 3 gouttes, sur une ligne horizontal, placée à 5 cm. du but inférieur du papier. Chaque goutte portait environ 80 µg. du produit. Le dépôt a été fait à l'aide d'une micro-pipette. On a intérêt de n'en déposer qu'une très petite quantité de liquide chaque fois, ainsi que le diamètre de la tache n'exécède pas de deux milimètres, en renouvelant le dépôt jusqu'à le contenu de la micro-pipette (environ 5 µl.) a été achevé.

Les chromatogrammes ont été développés sous la forme ascendante, pendant 36 heures (au lieu des 30 heures qui précèdent les auteurs de la méthode originelle), le solvant étant constitué par 70 per 100 d'alcool propylique primaire, 20 per 100 de l'eau distillée et 10 per 100 d'une solution tampon d'acetates 1 M, pH 5'0. La température pendant le développement fut 20-21° C.

Puis que les chromatogrammes ont été développés, son alors séchés à l'air.

Ensuite, chaque bande fut coupée longitudinalement en trois parties égales, l'une de lesquelles fut révélé pour y signaler la position des taches dans les autres deu portions.

Le révéléur a été constitué par : deux volumes de l'alcool éthylique 96 per 100, un volume de solution de soude 10 per 100, et 0'05 volumes de solution de ferricianure de potassium 2'5 per 100. Par l'action oxidante, les phosphates de thiamine devient les correspondants phosphates de thiochromme qui présentent intense fluorescence bleue sous la lumière ultraviolette. Il est intéressant ne couler le révéléur sur la surface du papier parce que les taches ne soient pas griffonnées.

Les portions non révélées sont alors employées pour l'élu-tion, évaluation du phosphor, épreuves d'activité biologique, etcétera.

Pour l'élution on a employé le dispositif montré dans la figure 1. Les cuvettes C ont de l'eau distillée ; entre deux plaques en verre est placée une bande de papier de filtre et, sur celle-ci, le fragment de papier contenant la tache à éluer. La portion de papier submergée détermine la vitesse d'élution.

Quand l'éluat est de 4 cm.<sup>3</sup>, l'opération peut être finie. Une durée d'environ 8 heures est satisfaisante. Aussi, il donna des bons résultats couper la tache en petits fragments et les laver avec 4 portions de l'eau d'un cm.<sup>3</sup> chaque. L'efficacité du lavage est vérifiée en révélant les papiers après l'élution pour constater qu'il n'y a pas vestige de fluorescence.

Pour le dosage du phosphore total dans ces éluats, ils ont été chauffés à 90-95° C jusqu'à sécheresse et, tout de suite, a été ajouté le SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> pour y détruire la matière organique, selon la méthode de Fiske et Subbarow (13).

Aussi, ont été réalisées des évaluations de phosphore total, sans préalable élution, en détruisant le papier avec l'aide du SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> concentré et plusieurs gouttes de NO<sub>3</sub>H ou ClO<sub>4</sub>H ; la destruction du papier est accélérée par l'addition d'une petite goutte d'une solution de sélénium dans le SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> conc. Il faut éliminer, par ébullition, tout vestige du NO<sub>3</sub>H ou ClO<sub>4</sub>H employés dans l'oxidation, avant d'ajouter les réactifs du phosphore.

Les déterminations du phosphate inorganique ou cet appelé «ionogène» furent réalisées aussi selon la méthode de Fiske et Subbarow (13), tenant compte que la concentration total d'esters de l'aneurine ne doit pas être supérieur à 50 µg/cm<sup>3</sup> pour éviter la formation d'un précipité de phosphomolybdate de thiamine. Quoiqu'il se forme une petite quantité du précipité, il est redissous par l'addition du réducteur. Pour l'évaluation du phosphor «acide-labile», l'échantillon, dissout ou élué, est traité par SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> jusqu'à concentration finale 0'8 n et bouilli in bain marie pendant 10 minutes. Après refroidissement, il est évalué le phosphate inorganique formé.

Les déterminations d'activité co-carboxylasique ont été réalisées dans l'appareil de Warburg, en employant de l'apo-carboxylase purifiée selon la méthode de Green et ses col. (14). Chaque flacon de Warburg reçut :

Une quantité de l'apocarboxylase telle que, en présence d'excès du cofermant (80 µg.) produit un dégagement de CO<sub>2</sub> de 4'0 × 10<sup>3</sup> µl/h.

0,27 mg. de Mg<sup>++</sup> et 0'19 mg. Mn<sup>++</sup>.

0.4 cm<sup>3</sup> d'une solution 1,1 M. de pyruvate de sodium, dans le bulbe latéral.

Solution tampon de citrate 0,04 M., pH 0,0 jusqu'à 3 cm<sup>3</sup> de volume total.

Température : 30° C. Atmosphère : air. Agitation. 160 osc./min.

La vitesse de la réaction, dans les conditions initiales, fut établi par une méthode graphique (15) par détermination de la tangente à l'origine dans la courbe du CO<sub>2</sub> libéré en fonction du temps. Les lectures manométriques furent faites chaque deux minutes, après 15 minutes pour l'équilibre thermique avant d'ajouter le substrat.

Le coferment fut constitué par diverses taches provenant des chromatogrammes non révélés, sans préalable élution, en coupant les papiers en petits fragments pour favoriser le contact avec l'apoferment.

### Résultats

La figure 2 montre le chromatogramme obtenu avec la cocarboxylase préparée par nous, selon la méthode de WEIJLARD et TAUBER (3). La figure 3 montre les chromatogrammes fournis

TABLEAU I

*Dosage du phosphor dans une co-carboxilase synthétique*

Tache	Phosphor acide-labile γ	Phosphor total γ	Rapport P labile/P total
A	—	8.0	—
B	4.5	10.7	0.43
C	5.0	8.4	0.65
D	5.4	7.2	0.76

par quelques cocarboxylases commerciales. La figure 4 montre le résultat de chromatographier les produits obtenus comme ester triphosphorique de la thiamine, en suivant les quatre méthodes décrites dans la section «Mode Opérateur».

TABLEAU II

Composition des co-carboxylases du commerce

Echantillon n.º	Per cent Monophosphate	Per cent Diphosphate	Per cent Triphosphate	Per cent Autres poliphosphates
1	5	90	4	—
2	17	80	<3	—
3	20	70	5	5
4	32	65	<3	—
5	40	45	10	4
6	55	40	4	<3
7	70	22	5	<3
8	80	18	<3	—
9	90	10	<3	—
10	96	<3	—	—
11	96	<3	—	—
12	50	30	15	—
13	25	70	<3	—
14				—

Dans le Tableau I on trouve les chiffres du dosage du phosphore labile et total, avec un échantillon typique, celui-là de la figure 2.

Le Tableau 2 montre les résultats du dosage du phosphore

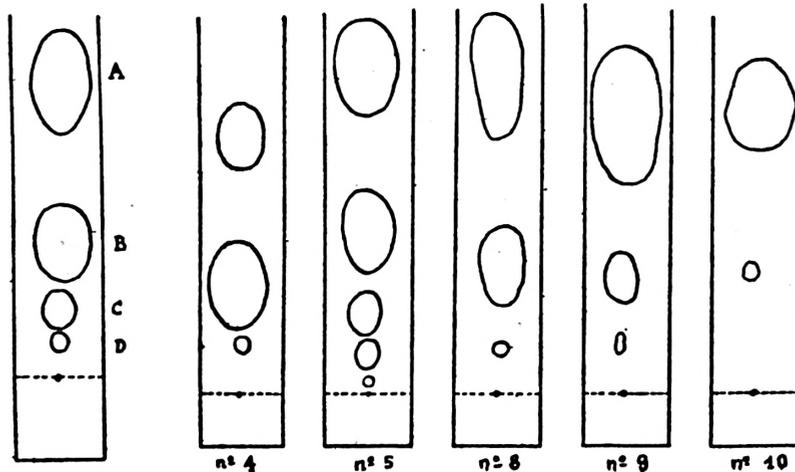


Fig. 2

Fig. 3

TABLEAU III  
 Activité co-carboxylasique des esters phosphoriques de l'aneurine

Produit add.	—	MPT 20 <sub>γ</sub>	DPT 10 <sub>γ</sub>	TPT 20 <sub>γ</sub>	DPT 10 <sub>γ</sub> + TPT 20 <sub>γ</sub>	DPT 10 <sub>γ</sub> + TPT 30 <sub>γ</sub>	DPT 10 <sub>γ</sub> + MPT 20 <sub>γ</sub>	DPT 10 <sub>γ</sub> + MPT 40 <sub>γ</sub>
Vitesse de réaction μ <sub>l</sub> cc <sup>2</sup> /hr.	1.0 × 10 <sup>2</sup>	1.0 × 10 <sup>2</sup>	1.3 × 10 <sup>3</sup>	1.0 × 10 <sup>2</sup>	1.3 × 10 <sup>3</sup>			

Abreviations: MPT = Monophosphate de thiamine  
 DPT = Diphosphate de thiamine  
 TPT = Triphosphate de thiamine

pour les taches des carboxylases commerciales (\*). Les lettres correspondent à celles de la figure 3.

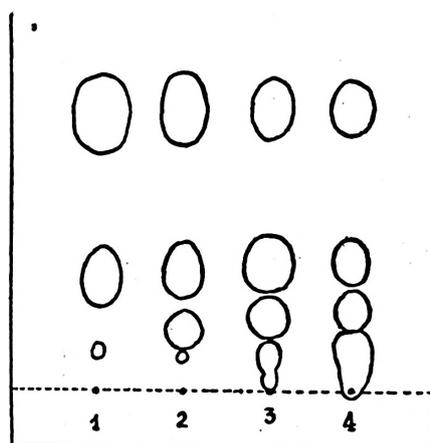


Fig 4

TABLEAU IV

*Teneur en ester triphosphorique des produits représentés dans la figure 4*

Produit	Per cent ester triphosphorique	Presence d'esters poliphosphoriques
selon la méthode n.º 1	5	—
> > > n.º 2	15	—
> > > n.º 3	30	+
> > > n.º 4	21	+++

Le Tableau III montre les résultats des évaluations d'activité co-carboxylasique avec produits identifiés comme esters

(\*) Échantillons provenant :  
 Les uns de la courtoisie des Laboratoires :  
 Alter, S. A. (Espagne).  
 Anonima Chimico Farmaceutica (Milano).  
 Dr. M. Calosi (Firenze, Italia).  
 F. I. R. M. A. (Firenze, Italia).  
 Istituto Farmaco-Biologico MARVIN (Milano).  
 et les autres, du commerce.

mono, di- et triphosphorique de thiamine. Toutes les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions et les valeurs sont corrigées pour la rétention.

Le Tableau IV montre les résultats du dosage du phosphore dans la tache de l'ester triphosphorique pour les échantillons représentés dans la figure 4. Avec les données du dosage du phosphore, ont été calculés les pourcentages de l'ester.

### Discussion

L'examen des figures montre que les produits de phosphorylation de la thiamine par les techniques usuelles, sont toujours mélanges de trois ou quatre esters et parfois, avec petites quantités d'autres esters polyphosphoriques. Plusieurs rapports publiés ci-devant sur l'action biologique d'un ou l'autre ester, correspondent vraiment à travaux réalisés avec un tel mélange, parfois très pauvre en l'ester dont on voulait évaluer l'activité.

Les résultats exposés dans le Tableau I ont été utilisés pour établir la composition de la chaîne phosphorique en chaque tache. La tache A (figure 2) n'a point du phosphore labile; il s'agit de l'ester monophosphorique. La tache B a un atome de phosphore acide-labile par deux de phosphore total, il s'agit donc de l'ester diphosphorique. Pour la tache C, la relation phosphore acide-labile/phosphore total vaut très voisine à  $2/3$  et pour la tache D, cette relation en vaut  $3/4$ ; par ces raisons, l'on est attribué la composition d'un ester triphosphorique et tétraphosphorique respectivement.

Les épreuves d'activité co-carboxylasique, montrées dans le Tableau III, sont très concluantes. Elles nous ont permis d'établir que l'ester triphosphorique de la thiamine n'a point d'activité comme co-carboxylase. A ce respect, nous avons déjà publié quelques-uns de nos premiers résultats (16). Récemment, ces conclusions ont été confirmées par ROSSI-FANELLI et K. H. KIESSLING (communication personnelle). Dans le Tableau III, on voit aussi que ni l'ester monophosphorique ni l'ester triphosphorique, dans les concentrations essayées, ont pouvoir inhibiteur; ils ne sont pas compétiteurs du cofacteur.

### Résumé

On fait une étude chromatographique des produits de phosphorylation directe de la thiamine avec l'acide phosphorique, en constatant que les produits sont, dans tout cas, des mélanges d'esters mono-, di-, tri- et

parfois, tetra-phosphorique. On montre que ni l'ester monophosphorique ni l'ester triphosphorique ont d'activité co-carboxylasique et non plus sont ils inhibiteurs de l'activité de l'ester diphosphorique.

\* \* \*

Agradecemos al Patronato Juan de la Cierva la beca con que ha subvencionado a uno de nosotros (G. de la Fuente) durante la realización de este trabajo.

### Bibliographie

- (1) LOHMANN, K., et SCHUSTER, PH. : *Biochem. Z.*; **294**, 188, 1937.
- (2) TAUBER, H. : *J. Am. Chem. Soc.*; **60**, 730, 1938.
- (3) WEIJLARD, J. : *J. Am. Chem. Soc.*; **63**, 1160, 1941.
- (4) WEIJLARD, J. et TAUBER, H. : *J. Am. Chem. Soc.*; **60**, 2263, 1938.
- (5) WEIL-MALHERBE, H. : *Biochem. J.*; **34**, 980, 1940.
- (6) KARRER, P. et VISCONTINI, M. : *Helv. Chim. Acta*; **29**, 711, 1946.
- (7) VISCONTINI, M., et KARRER, P. : *Helv. Chim. Acta*; **32**, 1478, 1949.
- (8) STERN, P., et HOFER, H. : *Science*; **35**, 483, 1937.
- (9) VELLUZ, L., AMIARD, G., et BARTOS, J. : *Bull. Soc. Chim.*; 871, 1948.
- (10) VELLUZ, L., et PESEZ, M. : *Bull. Soc. Chim.*; 868, 1950.
- (11) VELLUZ, L., AMIARD, G., et BARTOS, J. : *J. Biol. Chem.* **180**, 1137, 1949.
- (12) SILIPRANDI, D., et SILIPRANDI, N. : *Biochim. Biophys. Acta*; **14**, 52, 1954.
- (13) FISKE, C. H., et SUBBAROW, Y. : *J. Biol. Chem.*; **66**, 375, 1925.
- (14) GREEN, D. E., HERBERT, D., et SUBRAHMANYAN, V. : *J. Biol. Chem.*; **138**, 327, 1941.
- (15) DE LA FUENTE, G. : Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias de Madrid, 1955.
- (16) DE LA FUENTE, G., et DÍAZ-CADAVIECO, R. : *Nature*; **174**, 1014, 1954.