

CHROM. 5405

Identification des sucres contenus dans un extrait végétal et évaluation de leurs teneurs individuelles par chromatographie et photodensitométrie

Depuis le célèbre travail de PARTRIDGE¹, la séparation et l'identification des sucres par chromatographie a reçu une amélioration grâce à la chromatographie en couche mince.

Les supports suivants ont été utilisés: polyamide², gel de silice³⁻⁵, polycarbonate⁶, cellulose⁷⁻⁹. La poudre de cellulose a permis la meilleure séparation des sucres de nos extraits.

Pour l'évaluation quantitative, la photodensitométrie employée depuis 1950 (bibl. 10, 11) et tout récemment par DE STEFANIS ET PONTE³ nous a paru être le procédé le plus commode.

Séparation chromatographique

Mode opératoire

Il est voisin de celui de notre précédent travail¹² et n'en diffère que par les points suivants.

Développement. On utilise la phase supérieure de mélange butanol-acide acétique-eau (4:1:5) préparé depuis plus de trois semaines et moins de trois mois. Afin d'avoir un étalement suffisant des R_F , on procède à une deuxième migration dans le même sens après avoir laissé sécher la plaque horizontale toute la nuit.

Révélation. Le composé formé par l'acide tartrique et l'aniline a un coefficient d'extinction moléculaire supérieur à celui formé avec les autres acides organiques, y compris l'acide phtalique ou l'acide phosphorique. Le révélateur retenu pour les aldoses est le mélange: acide tartrique (1.50 g)-aniline (0.93 ml)-butanol saturé d'eau (100.00 ml).

On chauffe pendant 10 min à 100°; les aldoses donnent des taches marron.

Pour les autres sucres, nous avons retenu le mélange: aldéhyde anisique (5 ml) mélangé extemporanément à: alcool éthylique (90 ml)-acide sulfurique $d = 1.8$ (5 ml)-acide acétique (1 ml).

Par chauffage à 100°, pendant 4 min environ, on obtient des taches roses. L'évolution de la coloration est observée à travers un hublot. L'homogénéité du fond est améliorée par rotation constante de la plaque à l'intérieur de l'étuve (Fig. 1).

Les résultats sont reproduits sur la Fig. 2.

Les R_F des différents sucres étudiés et leur R_F' (après double migration) sont groupés dans le Tableau I. (Le solvant de migration utilisé était préparé depuis deux mois.)

Discussion

L'âge du solvant a une incidence importante sur la netteté de la séparation et sur la valeur des R_F . Les développements réalisés avec un solvant préparé depuis moins de trois semaines, présentent des traînées; avec un solvant de plus de trois mois il y a diminution des R_F .

Les R_F de sucres autres que ceux contenus dans nos extraits sont groupés dans le Tableau II.

Ces sucres n'interfèrent ni avec les précédents ni entre eux.

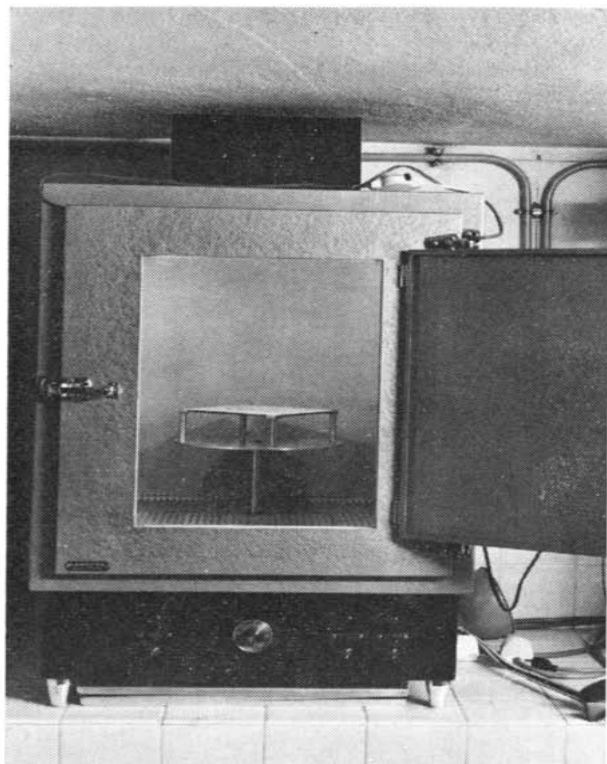


Fig. 1. Vue de l'étuve avec hublot et dispositif permettant la rotation de la plaque.

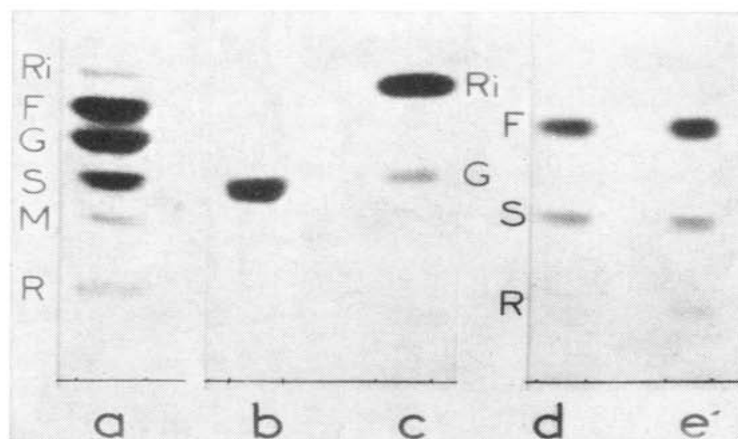


Fig. 2. (a) Autoradiographie de chromatogramme de sucres marqués par incorporation de $^{14}\text{CO}_2$. (b et d) extrait de feuille (*Vitis vinifera*). (c et e) solution témoin. (b et c) révélation tartrate d'aniline. (d et e) révélation aldehyde anisique. R = raffinose, M = maltose, S = saccharose, G = glucose, F = fructose, Ri = ribose.

TABLEAU I

VALEUR COMPARÉE DES R_F EN SIMPLE ET EN DOUBLE MIGRATION

	R_F	$R_{F'}$
Raffinose	0.14	0.26
Maltose	0.22	0.39
Saccharose	0.29	0.48
Glucose	0.33	0.55
Fructose	0.37	0.60
Ribose	0.43	0.68

Evaluation photodensitométrique

Mode opératoire. Les mesures sont effectuées dans les mêmes conditions que dans notre précédent travail¹².

L'alternance des R_F des aldoses et des autres sucres permet en employant les deux révélateurs sur deux plaques distinctes portant un même échantillon, d'augmenter l'intervalle entre deux taches successives; ainsi le scripteur du photodensitomètre peut regagner la ligne de base entre deux taches.

Un filtre Wratten 47B est placé entre la plaque chromatographique et la cellule

quand le tartrate d'aniline est employé comme révélateur; on n'utilise aucun filtre pour les plaques révélées par l'aldéhyde anisique.

TABLEAU II

R_F DE SUCRES ABSENTS DE NOS EXTRAITS VÉGÉTAUX ET R_F' OBTENU EN DOUBLE MIGRATION

	R_F	R_F'
Stachyose	0.05	0.07
Lactose	0.16	0.30
Mélibiose	0.24	0.42
Galactose	0.31	0.52
Mannose	0.35	0.58
Arabinose	0.36	0.59
Xylose	0.40	0.65

La surface des pics est déterminée par totalisation des "tops" inscrits par le photodensitomètre. Cependant si la teinte de fond de la couche mince n'est pas homogène, il faut déterminer la surface des pics par pesée après découpage.

Résultats et discussion. La Fig. 3 montre la relation existant entre la quantité de sucre déposée et la surface du pic enregistré.

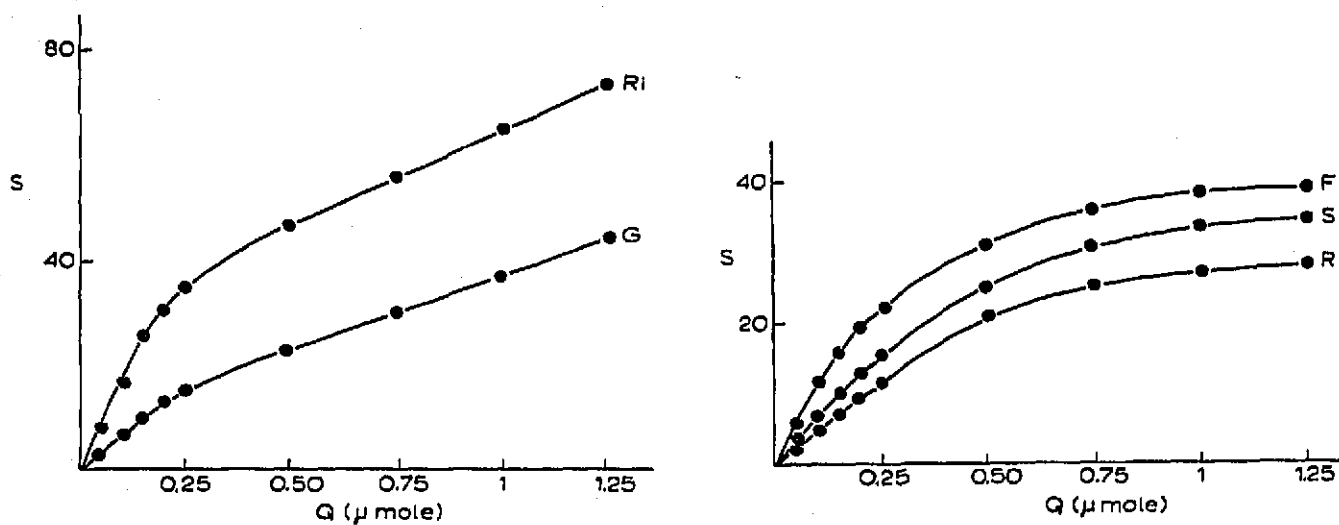


Fig. 3. Relation entre la surface d'un pic (déterminée par pesée exprimée en mg), et la quantité de sucre déposée exprimée en micromolécule gramme d'ose. Ri = Ribose, G = Glucose. Révélation par tartare d'aniline. R = Raffinose, S = Saccharose, F = Fructose. Révélation par aldéhyde anisique.

Les dépôts doivent être compris entre 0.25 et 0.75 μ mole d'ose. On détermine ensuite la valeur exacte de la quantité déposée par ajustement avec la courbe étalon au moyen d'un abaque.

La précision des résultats est de l'ordre de $\pm 8\%$. Comme dans toute micro-méthode, cette précision peut être grandement altérée par l'intervention subite d'une cause qui échappe au manipulateur (perte d'une partie de l'échantillon, irrégularité dans la révélation). Aussi est-il prudent de traiter chaque échantillon au moins deux fois sur des plaques différentes qui subiront séparément les diverses manipulations de la technique, soit quatre plaques par échantillon.

Les taches obtenues avec le tartrate d'aniline sont d'un contraste optimum 20 h après la révélation. Deux à trois jours après le contraste diminue du fait de l'apparition d'une teinte de fond.

Les taches obtenues avec l'aldéhyde anisique ont leur contraste optimum 3 à 5 h après la révélation. Elles s'estompent ensuite lentement.

Du fait de la présence de témoins ces évolutions de coloration ne portent pas atteinte à la précision de la méthode.

Conclusion

La technique chromatographique proposée permet d'obtenir, à partir d'un extrait végétal, la séparation selon des taches nettes des six sucres les plus courants de la biochimie végétale: ribose, fructose, glucose, saccharose, maltose, raffinose. Six autres sucres que nous n'avons pas rencontrés dans nos extraits peuvent également être identifiés sans interférer.

En révélant séparément les aldoses d'une part et les autres sucres d'autre part, on peut effectuer une évaluation photodensitométrique des teneurs individuelles avec une précision déjà acceptable.

*Institut National de la Recherche Agronomique,
Station de Recherches Viticoles,
Centre de Recherches Agronomiques, 34 - Montpellier (France)*

F. CHAMPAGNOL*

*Institut National de la Recherche Agronomique,
Station d'Oenologie et de Technologie Végétale,
11 - Narbonne (France)*

M. BOURZEIX*

- 1 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- 2 J. P. MARAIS, *J. Chromatogr.*, 27 (1967) 321.
- 3 V. A. DE STEFANIS ET J. G. PONTE, Jr., *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 116.
- 4 H. WIELE ET E. HORAK, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 527.
- 5 D. J. BELL ET M. Q.-K. TALUKDER, *J. Chromatogr.*, 49 (1970) 469.
- 6 M. BOUNIAS, *Chim. Anal.*, 51 (1969) 76.
- 7 A. SCHWEIGER, *J. Chromatogr.*, 9 (1962) 374.
- 8 M. L. WOLFROM, D. L. PATIN ET R. M. DE LEDERKREMER, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 488.
- 9 J. F. MC KELVY ET J. R. SCOCCA, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 316.
- 10 E. F. MC FARRREN, K. BRAND ET H. R. RUTKOWSKI, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1146.
- 11 J. B. HIMES, L. D. METCALFE ET H. RALSTON, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 364.
- 12 M. BOURZEIX, J. GUITRAUD ET F. CHAMPAGNOL, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 83.

Reçu le 17 février 1971; manuscrit modifié reçu le 5 avril 1971

* Avec la collaboration technique de Mme. H. COMPAN