

CHROM. 6368

Identification, par chromatographie sur couches minces, des acides organiques préalablement séparés quantitativement sur colonne de gel de silice

L'étude quantitative des acides organiques des tissus végétaux se fait en général en utilisant soit la chromatographie en phase gazeuse¹⁻³, soit la chromatographie d'échanges d'ions, sur résines anioniques⁴⁻⁷, soit la chromatographie de partage sur gel de silice⁸⁻¹¹. Mais ces méthodes d'analyses peuvent se révéler insuffisantes dans le cas d'études approfondies du métabolisme, car elles conduisent fréquemment à des séparations incomplètes des différents acides, souvent élués par groupes de deux ou trois.

La détermination de la nature exacte des acides partiellement séparés par ces méthodes pose un problème qui prend davantage d'importance si les molécules organiques des tissus analysés sont marquées par des radiotraceurs, ¹⁴C par exemple.

Il est alors nécessaire de séparer les différents acides des fractions ainsi obtenues en utilisant soit la chromatographie sur papier¹²⁻²⁰, soit la chromatographie sur couches minces²¹⁻³¹. Il est à noter que l'emploi de cette dernière méthode tend à se développer, en raison de sa rapidité d'emploi et de l'apparition sur le marché de plaques minces prêtes à l'emploi.

Dans la présente note, nous décrivons la technique que nous avons mise au point pour séparer et identifier par chromatographie monodimensionnelle ou bidimensionnelle, sur couches minces, les groupes d'acides, préalablement fractionnés par chromatographie sur gel de silice.

Matériel et méthodes

Acides organiques

Les acides organiques d'un mélange synthétique, préparé à partir des acides "puriss" du commerce (Merck ou Fluka), sont d'abord séparés quantitativement sur une colonne de gel de silice, selon la technique de BOVÉ ET RAVEUX¹¹, modifiée par JOLIVET³².

La solution d'acides organiques, contenant 50-100 μ equiv. de chacun des acides, est amenée à sec sous air comprimé. Le résidu est repris par 1 ml de H₂SO₄ 5 N et 2 g de silice Mallinckrodt (100 mesh), puis déposé à l'aide de chloroforme au sommet d'une colonne contenant 8 g de silice¹¹. Les acides organiques sont alors élués par une série de mélanges contenant des proportions de plus en plus élevées de butanol tertiaire dans le chloroforme (8%, 13%, 20%, 28%, 35%, en volume)¹¹, sous des pressions respectives de 0.2, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 kg/cm² (ref. 32). Les éluats, recueillis sur un collecteur par fractions de 4 ml (ref. 32), sont titrés par NaOH 0.01 N en présence de 1 ml d'une solution aqueuse de rouge de phénol à 20 mg/l.

Cette technique permet de classer les acides en huit groupes (I-VIII), bien définis:

- (I) Mésaconique, phtalique, fumarique
- (II) Itaconique, méthylsuccinique, méthylmalonique
- (III) Lactique, succinique, malonique, *trans*-aconitique
- (IV) Pyrrolidone carboxylique, oxalique, glycolique, *cis*-aconitique
- (V) Citramalique, isomalique, malique
- (VI) Citrique, isocitrique, glycérique

- (VII) Shikimique, quinique
(VIII) Tartrique.

Couches minces

Après leur titration, les acides peuvent être chromatographiés, soit directement à l'état de sels, en utilisant des plaques de verre, recouvertes de cellulose et de Dowex 50W (Schleicher et Schüll, 20 × 20 cm, 100- μ d'épaisseur, G-1440/K-10), soit, après désalification (Dowex 50, forme H⁺), en employant des plaques flexibles, recouvertes de cellulose (Schleicher et Schüll, 20 × 20 cm, 100- μ d'épaisseur, F-1440).

Solvants

Les séparations monodimensionnelles ou bidimensionnelles, analogues pour les deux types de plaques, sont faites par des solvants, ou fortement acides (acide formique), ou fortement basiques (ammoniaque), de façon, soit à réduire, soit à rendre totale, l'ionisation des acides à chromatographier, et par suite à supprimer la formation de traînées^{12,15,16}.

Solvant A. *n*-Propanol-benzoate de méthyle-acide formique 90%-eau (7:3:2:1), préparé une dizaine de jours avant emploi (CHEFTEL *et al.*^{15,16}, modifié par BOVÉ¹¹). L'introduction de benzoate de méthyle permet d'éliminer plus rapidement l'acide formique des chromatogrammes et d'obtenir ainsi, après révélation des taches plus nettes, sur fond plus contrasté^{15,16}. La distance parcourue par ce solvant en 4 h, à 21°, est de 15 cm.

Solvant B. *n*-Propanol-éthanol 96° G.L.-ammoniaque (d = 0.88)-eau (6:6:6:1.5). À 21°, ce solvant met 10 h pour parcourir 15 cm.

Solvant C. Phase supérieure du mélange suivant^{23,26}, préparé une dizaine de jours avant emploi: *n*-alcool amylique-acide formique 90%-eau (4:4:2). À 21° ce solvant parcourt 15 cm en 3 h.

Le choix des alcools utilisés (éthanol 96° G.L., *n*-propanol, *n*-alcool amylique) est basé sur le fait que leur efficacité est connue pour être en relation avec leur nombre d'atomes de carbone, qui conditionne lui-même leur capacité de saturation en eau^{18,19,33}.

Séparation chromatographique

Des parties aliquotes des fractions acides (20 μ g par acide) sont déposées sur les couches minces. Celles-ci sont alors séchées dans un courant d'air, à température ambiante, puis placées dans des cuves à chromatographie, cylindriques ($d = 24$ cm, $h = 24$ cm), en verre, préalablement saturées par les solvants utilisés. La saturation de l'atmosphère des cuves est améliorée en tapissant leurs parois de papier filtre, imprégné par les mêmes solvants.

Le développement, unidimensionnel ou bidimensionnel, est fait par chromatographie ascendante, à température sensiblement constante (21 \pm 0.5°).

Révélation

Après leur développement, les chromatogrammes sont séchés à 40°, pendant 4 h, dans une étuve ventilée, ce qui permet d'éliminer toute trace de solvant. Cependant, on doit noter qu'il y a lieu de ne pas trop sécher les chromatogrammes développés en milieu basique. Un séchage excessif entraînerait une élimination complète de l'ammoniaque dissoute dans l'eau liée, constitutive de la poudre de cellulose. Une telle pratique se traduirait par un manque de contraste des taches d'acides organiques, après leur révélation¹⁶.

Il est possible de mettre en évidence les taches des différents acides, soit en pulvérisant sur les chromatogrammes des indicateurs colorés: vert de bromocrésol^{12,26},

pourpre de bromocrésol^{25,28}, bleu de bromophénol^{12,20,20,31}, bleu de bromothymol²⁷, etc., soit en aspergeant les chromatogrammes de révélateurs plus complexes: réactif amylose-iodure-iodate^{14,34}, réactif aniline-sucres réducteurs^{30,35}, réactif *p*-diméthylaminobenzaldehyde dans l'anhydride acétique^{20,36}, etc.

Nous préférons, quant à nous, utiliser les réactifs suivants:

(a) *Réactif de PÁSKOVÁ ET MUNK*³⁷. Mélange de volumes égaux, au moment de l'emploi, des deux solutions suivantes: Solution 1: vert de bromocrésol (375 mg), bleu de bromophénol (125 mg), éthanol absolu (500 ml). Solution 2: KMnO₄ (250 mg), Na₂CO₃ · 10 H₂O (500 mg), eau déionisée (500 ml). Ce réactif, après pulvérisation sur les chromatogrammes, donne des teintes variées avec tous les acides, et en particulier, une teinte plus ou moins verte, avec les acides insaturés (fumarique, itaconique, aconitique, shikimique).

(b) *Nitrate cérrique ammoniacal*^{17,38}. Pulvérisation d'une solution nouvellement préparée, de nitrate cérrique ammoniacal à 10%, dans le méthanol ou l'éthanol. Après séchage (10 min à température ambiante), les acides apparaissent différemment colorés sur fond orangé. Une seconde aspersion par une solution à 0.25% d'indole dans le méthanol ou l'éthanol, améliore les contrastes. Ce réactif permet d'identifier les acides α -hydroxylés.

(c) *Réactif au perchlorate de flavylum*³⁹. Ce réactif est spécifique de l'acide malonique. Après pulvérisation d'une solution de perchlorate de flavylum (250 mg)

TABLEAU I

VALEURS DES R_F DES ACIDES ORGANIQUES SÉPARÉS PAR CHROMATOGRAPHIE UNIDIMENSIONNELLE SUR COUCHES MINCES DE CELLULOSE

Acide	Solvant A	Solvant B	Solvant C	Couleur des taches ^a
Mésaconique	0.88	0.65	0.72	jaune cerclé de vert
Phtalique	0.84	0.62	0.55	rose cerclé de jaune
Fumarique	0.82	0.58	0.50	jaune cerclé de vert
Itaconique	0.79	0.52	0.41	jaune cerclé de vert
Méthylsuccinique	0.82	0.59	0.48	rose-violet cerclé de jaune
Méthylmalonique	0.80	0.43	0.41	rose-violet cerclé de jaune
Lactique	0.72	0.79	0.32	orange cerclé de rouge
Succinique	0.73	0.52	0.25	orange cerclé de violet
Malonique	0.68	0.39	0.19	orange cerclé de violet
<i>trans</i> -Aconitique	0.76	0.29	0.14	jaune cerclé de vert
Pyrrolidone carboxylique	0.57	0.71	0.16	rose cerclé de jaune
Oxalique	0.65	0.03	0.13	violet-pourpre
Glycolique	0.57	0.70	0.15	rose-jaune
<i>cis</i> -Aconitique	0.39	0.29	0.04	jaune cerclé de vert
Citramalique	0.65	0.52	0.14	rose cerclé de pourpre
Isomalique	0.63	0.42	0.11	rose-jaune cerclé de vert
Malique	0.50	0.47	0.06	jaune-orange cerclé de violet
Citrique	0.42	0.24	0.04	jaune-rose cerclé de violet
Isocitrique	0.40	0.23	0.03	blanc-orange cerclé de violet
Glycérique	0.36	0.66	0.06	rose cerclé de pourpre
Shikimique	0.32	0.64	0.03	jaune cerclé de vert
Quinique	0.18	0.66	0.02	rose cerclé de pourpre
Tartrique	0.31	0.40	0.02	rouge-pourpre cerclé de violet

^a Couleurs d'après le réactif de PÁSKOVÁ ET MUNK³⁷.

dans l'acide acétique concentré (100 ml) et chauffage des chromatogrammes (5 min à 105°), l'acide malonique apparaît coloré en bleu foncé, sur fond blanc.

(d) *Réactif au vanadate d'ammonium*^{17,20,40}. Après pulvérisation d'une solution aqueuse saturée de vanadate d'ammonium, l'acide tartrique donne en particulier une couleur rouge caractéristique.

(e) *Réactif au périodate de sodium*⁴¹. Après pulvérisation d'une solution de périodate de sodium (160 mg) dans un tampon acétate (25 ml) nouvellement préparé, suivie d'une pulvérisation d'une solution alcoolique à 3% d'aniline, l'acide shikimique apparaît rouge sur fond jaune.

Résultats

Les données relatives à la séparation des groupes d'acides (I-VIII) par chromatographie unidimensionnelle, sont résumées dans le Tableau I.

Le solvant A sépare en particulier très bien les groupes d'acides: malique-isomalique (V); malique-citramalique (V); shikimique-quinique (VII).

Le solvant B peut être utilisé pour séparer les groupes d'acides suivants: itaconique-méthylsuccinique-méthylmalonique (II); lactique-succinique-malonique-*trans*-aconitique (III); pyrrolidone carboxylique ou glycolique-oxalique-*cis*-aconitique (IV); isomalique-citramalique (V); citrique ou isocitrique-glycérique (VI).

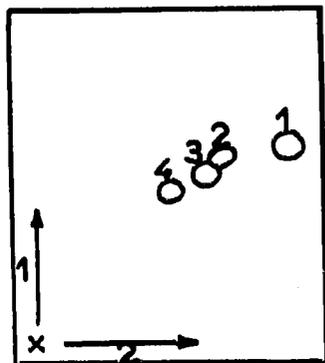


Fig. 1

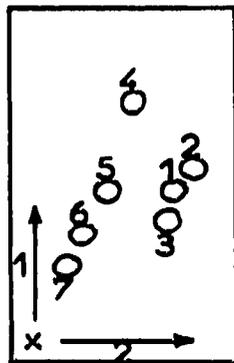


Fig. 2

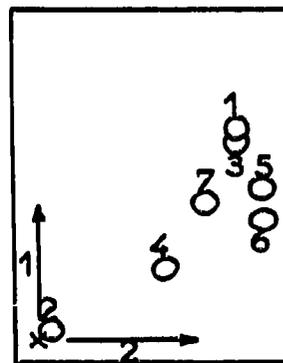


Fig. 3

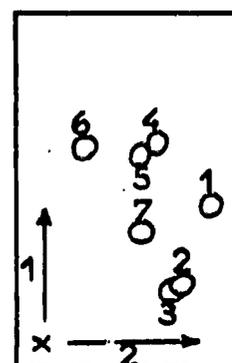


Fig. 4

Fig. 1. Chromatographie bidimensionnelle des acides organiques sur couche mince de cellulose. 1 = Mésaconique; 2 = phtalique; 3 = fumarique; 4 = itaconique. Solvant B (1), *n*-propanol-éthanol (96° G.L.)-NH₄OH (d = 0.88)-eau (6:6:6:1.5). Solvant C (2), *n*-alcool amylique-acide formique 90%-eau (4:4:2).

Fig. 2. Chromatographie bidimensionnelle des acides organiques sur couche mince de cellulose. 1 = Itaconique; 2 = méthylsuccinique; 3 = méthylmalonique; 4 = lactique; 5 = succinique; 6 = malonique; 7 = *trans*-aconitique. Solvant B (1), *n*-propanol-éthanol (96° G.L.)-NH₄OH (d = 0.88)-eau (6:6:6:1.5). Solvant C (2), *n*-alcool amylique-acide formique 90%-eau (4:4:2).

Fig. 3. Chromatographie bidimensionnelle des acides organiques sur couche mince de cellulose. 1 = Pyrrolidone carboxylique; 2 = oxalique; 3 = glycolique; 4 = *cis*-aconitique; 5 = citramalique; 6 = isomalique; 7 = malique. Solvant B (1): *n*-propanol-éthanol (96° G.L.)-NH₄OH (d = 0.88)-eau (6:6:6:1.5). Solvant A (2), *n*-propanol-benzoate de méthyle-acide formique 90%-eau (7:3:2:1).

Fig. 4. Chromatographie bidimensionnelle des acides organiques sur couche mince de cellulose. 1 = Malique; 2 = citrique; 3 = isocitrique; 4 = glycérique; 5 = shikimique; 6 = quinique; 7 = tartrique. Solvant B (1), *n*-propanol-éthanol (96° G.L.)-NH₄OH (d = 0.88)-eau (6:6:6:1.5). Solvant A (2), *n*-propanol-benzoate de méthyle-acide formique 90%-eau (7:3:2:1).

Le solvant C permet une bonne séparation des acides: mésaconique-fumarique (I); mésaconique-phthalique (I); métylsuccinique-méthylmalonique (II); lactique-succinique-malonique-*trans*-aconitique (III).

Les différentes teintes, obtenues par emploi des divers réactifs plus ou moins spécifiques, permettent de lever éventuellement toute ambiguïté pouvant surgir d'une séparation insuffisante.

En combinant de manière judicieuse les trois systèmes de solvants: A, B, et C, dans une chromatographie bidimensionnelle, il est possible d'obtenir encore des séparations bien meilleures (Fig. 1-4).

Discussion et conclusion

En chromatographie monodimensionnelle, selon les types de solvants utilisés, les valeurs des R_F obtenus sont plus ou moins reproductibles d'un essai à l'autre. Si ces valeurs demeurent très constantes dans le cas des chromatographies en milieu acide (notamment solvant A), de très légères variations des valeurs des R_F sont observées si les chromatographies sont faites en milieu basique (solvant B). Ces observations sont d'ailleurs en accord avec celles de CHEFTEL *et al.*¹⁶.

En chromatographie bidimensionnelle, le choix du solvant utilisé pour la première dimension présente une grande importance. Il est recommandé d'utiliser en première dimension le solvant basique et, en seconde dimension, le solvant acide¹⁶. Mais, dans ces conditions, les valeurs des différents R_F , en milieu acide (seconde dimension), peuvent être légèrement perturbées⁴².

En ce qui concerne, plus particulièrement le comportement de quelques acides bien déterminés nous pouvons faire les remarques suivantes:

L'acide oxalique, du fait d'une constante de dissociation plus forte que celle de l'acide formique, donne des taches allongées s'il est chromatographié en milieu acide¹⁶.

La chromatographie de l'acide lactique peut se traduire par la formation de une ou deux taches supplémentaires, correspondant à des taches de dimères (acide lactyl-lactique) ou de trimères (acide lactyl-lactyl-lactique)¹⁷.

En milieu basique, les acides *cis*- et *trans*-aconitique ne donnent qu'une seule tache³³, alors qu'en milieu acide, la valeur du R_F de l'acide *trans*-aconitique est supérieure à celle de l'acide *cis*-aconitique. Cette dernière observation est conforme à celles de HOWE³³ et de OTTEN ET MEHLTRETTER⁴³. Il faut noter aussi que la chromatographie des deux isomères *cis*- et *trans*-aconitique, en milieu basique et en milieu acide, s'accompagne souvent de l'apparition d'une tache supplémentaire, située au niveau du front du solvant.

L'examen du Tableau I et des Fig. 3 et 4 montre que l'utilisation des types de solvants A, B, et C, en chromatographie uni- ou bidimensionnelle, ne permet pas de séparer convenablement les acides pyrrolidone carboxylique et glycolique d'une part, citrique et isocitrique d'autre part. S'il est possible, par chromatographie sur couches minces de cellulose, de séparer les acides pyrrolidone carboxylique et glycolique, en utilisant un solvant neutre (alcool amylique tertiaire-méthyléthylcétone-eau (4:4:2), la séparation directe des acides citrique et isocitrique, par chromatographie ascendante, n'a pas été obtenue, à moins de convertir au préalable l'acide isocitrique en lactone isocitrique⁴⁴.

La technique présentée dans cette note permet de déterminer avec la plus grande certitude la nature des acides organiques préalablement séparés quantitative-

ment et ainsi de mieux comprendre et interpréter les voies du métabolisme de ces acides dans les tissus végétaux.

Laboratoire du Métabolisme Intermédiaire,
Département Physiologie Végétale,
I.N.R.A., 78 Versailles (France)

J.-F. MOROT-GAUDRY
M.-Z. NICOL
E. JOLIVET

- 1 P. MAZLIAK ET L. SALSAC, *Phytochemistry*, 4 (1965) 693.
- 2 R. B. CLARK, *Crop Sci.*, 9 (1969) 341.
- 3 P. MORARD ET E. BOURRIER, *Chim. Anal. (Paris)*, 53 (1971) 315.
- 4 H. BUSCH, R. B. HURLBERT ET U. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 717.
- 5 H. S. OWENS, A. E. GOODBAN ET J. B. STARK, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1507.
- 6 J. K. PALMER, *Conn. Agr. Exp. Sta. New Haven, Bull.*, (1955) 589.
- 7 G. FAUCONNEAU, *Ann. Agron. Suppl.*, 1 (1958) 1.
- 8 F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.*, 40 (1946) 688.
- 9 W. A. BULEN, J. E. VARNER ET R. C. BURRELL, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 187.
- 10 G. JOLCHINE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38 (1956) 481.
- 11 J. BOVÉ ET R. RAVEUX, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1957) 376.
- 12 J. W. LUGG ET B. T. OVERELL, *Nature*, 160 (1947) 87.
- 13 A. JERMSTAD ET K. B. JENSEN, *Pharm. Acta Helv.*, 25 (1950) 209.
- 14 A. G. LONG, J. R. QUAYLE ET R. J. STEDMAN, *J. Chem. Soc.*, III (1951) 2197.
- 15 R. I. CHEFTEL, R. MUNIER ET M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 840.
- 16 R. I. CHEFTEL, R. MUNIER ET M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34 (1952) 380.
- 17 M. L. BUCH, R. MONTGOMERY ET W. L. PORTER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 489.
- 18 F. A. ISHERWOOD ET C. S. HANES, *Biochem. J.*, 55 (1953) 824.
- 19 S. L. RANSON, dans K. PAECH ET M. V. TRACEY (Éditeurs), *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. II, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955, p. 539.
- 20 F. STERN, G. GRUMET, F. TRABAL, A. MENNIS ET H. H. ZINSSER, *J. Chromatogr.*, 19 (1965) 130.
- 21 D. BRAUN ET H. GEENEN, *J. Chromatogr.*, 7 (1962) 56.
- 22 H. J. PETROWITZ ET G. PASTUSKA, *J. Chromatogr.*, 7 (1962) 128.
- 23 A. SCHWEIGER, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 124 (1963) 20.
- 24 E. BANCHER ET H. SCHERZ, *Mikrochim. Acta*, (1964) 1159.
- 25 N. S. RAJAGOPAL, P. K. SARASWATHY, M. R. SUBBARAM ET K. T. ACHAYA, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 217.
- 26 J. DITTMANN, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 407.
- 27 S. BRUN ET G. GRAU, *Qual. Plant Mater. Veg.*, 16 (1968) 197.
- 28 W. F. MYERS ET KUN-YEN-HUANG, *Methods Enzymol.*, 13 (1969) 431.
- 29 D. BARALDI, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 125.
- 30 M. BOURZEIX, J. GUITRAUD ET F. CHAMPAGNOL, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 83.
- 31 T. S. K. CHANG ET H. T. CHAN, JR., *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 330.
- 32 E. JOLIVET, *Thèse Doct. (État) Sci. Nat.*, Orsay, France, 1969.
- 33 J. R. HOWE, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 389.
- 34 L. CHAFETZ ET M. H. PENNER, *J. Chromatogr.*, 49 (1970) 340.
- 35 J. SAARNIO, F. NISKASAARI ET C. GUSTAFSSON, *Suom. Kemistilehti B*, 25 (1952) 25.
- 36 G. W. GAFFNEY, K. SCHREIER, N. DI FERRANTE ET K. I. ALTMAN, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 695.
- 37 J. PÁSKOVÁ ET V. MUNK, *J. Chromatogr.*, 4 (1960) 241.
- 38 M. TROP, S. GROSSMAN ET A. PINSKY, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 411.
- 39 K. FORMANEK ET H. HÖLLER, *J. Chromatogr.*, 2 (1959) 652.
- 40 E. JAFFE, *Chimica*, 4 (1949) 307.
- 41 S. YOSHIDA ET M. HASEGAWA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 70 (1957) 377.
- 42 R. I. CHEFTEL, R. MUNIER ET M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 36 (1954) 429.
- 43 J. G. OTTEN ET C. L. MEHLTRETTER, *Anal. Biochem.*, 35 (1970) 1.
- 44 R. I. CHEFTEL, R. MUNIER ET M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35 (1953) 1095.

Reçu le 12 juin 1972 ; manuscrit modifié reçu le 18 septembre 1972