

CHROM. 6331

PROCÉDÉ D'IDENTIFICATION ET DE PRÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ÉTHERS DI-, TRI- ET TÉTRAMÉTHYLIQUES DE L' α -MÉTHYL-D-MANNOSE*

B. FOURNET ET J. MONTREUIL

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, B. P. No. 36, 59650-Villeneuve d'Ascq (France)

(Reçu le 21 août 1972)

SUMMARY

Analytical and preparative gas-liquid chromatography of α -methyl-D-mannoside di-, tri- and tetramethyl ethers

Partial methylation of α -methyl-D-mannoside produces a mixture of di-, tri- and tetramethyl ethers that are fractionated by gas-liquid chromatography on Carbowax 6000/Chromosorb W-AW-HMDS columns. All ethers are separated except the 2,3,4- and 3,4,6-methyl derivatives, which have to be further fractionated on the same columns in the form of TMS-derivatives.

INTRODUCTION

Les éthers méthyliques des monosaccharides destinés à servir de produits de référence dans l'exploration de la structure des polysaccharides libres et conjugués sont généralement préparés par synthèse organique. Ce genre de procédé est toujours d'application longue et délicate, principalement en ce qui concerne les dérivés méthylés du D-mannose. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers la chromatographie préparative en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus par un procédé de méthylation partielle de l' α -méthyl-D-mannoside inspiré de la technique de HANDA ET MONTGOMERY¹. Dans le présent mémoire, nous décrivons une méthode simple et rapide qui permet d'identifier et d'isoler les dérivés tétra-, tri- et diméthylés de l' α -méthyl-D-mannoside que l'on rencontre le plus couramment dans les méthanolysats des polysaccharides et des glycannes contenant du D-mannose.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthylation partielle de l' α -méthyl-D-mannoside

À une solution maintenue à 0° de 8 g d' α -méthyl-D-mannoside (K & K Laboratories), séché sous vide en présence de P₂O₅ pendant 24 h, dans 140 ml de N,N-diméthylformamide (Merck), on ajoute, par petites fractions et sous agitation

* Ces recherches s'intègrent dans le travail de thèse de Doctorat ès Sciences de B. FOURNET.

constante, 12 ml d'iodure de méthyle (Prolabo) et 29 g d'oxyde d'argent préparé extemporanément selon le procédé de WHISTLER ET WOLFROM². On laisse ensuite le mélange se réchauffer progressivement à la température du laboratoire et on le maintient encore sous agitation constante pendant 8 h. Les produits insolubles sont éliminés par filtration et sont soigneusement lavés sur le filtre avec du chloroforme. Le filtrat final (volume: 600 ml environ) est abandonné à + 4° pendant une nuit et débarrassé par une filtration des sels d'argent colloïdaux et des formyl-dérivés qui ont cristallisé. La solution obtenue est traitée cinq fois consécutives par 200 ml d'eau distillée dans une ampoule à décanter. On obtient ainsi une "phase aqueuse" qui est purifiée par passage successif sur des colonnes (4 × 40 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50-X8; "mesh" 25-50; H⁺), puis d'anions (Duolite A-102 D; "mesh" 25-50; HCO₃⁻). La solution effluente, à laquelle on joint les eaux de lavage des colonnes (4 l), est évaporée sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un sirop qui renferme les éthers méthyliques hydrosolubles. Après ce lavage à l'eau distillée, la fraction organique résiduelle est traitée par 100 ml d'une solution aqueuse à 1 % de thiosulfate de sodium, séchée par agitation en présence de sulfate de sodium anhydre et évaporée jusqu'à l'obtention d'un sirop qui représente la "phase organique" et contient les éthers méthyliques insolubles dans l'eau. La réassociation des deux phases constitue l'"extrait total".

Chromatographie en phase gazeuse des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside

Chromatographie analytique. Les éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions expérimentales suivantes: appareil Aerograph 1200 muni d'un détecteur à ionisation de flamme; colonne de verre (0.3 × 300 cm) remplie de Chromosorb W-AW-HMDS ("mesh" 60-80) contenant 3 % de Carbowax 6000; température de la colonne 170°, de l'injecteur 200° et du détecteur 210°; débit du gaz vecteur (azote) 30 ml/min. Les temps de rétention ont été calculés par rapport au temps de passage de l' α -méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-mannoside.

Les dérivés triméthylsilylés des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside, obtenus par le procédé de SWEELEY *et al.*³, ont été soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions décrites ci-dessus à la modification près de la température de la colonne qui a été programmée de 100 à 150° (augmentation de 1° par min).

Chromatographie préparative. Les éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside ont été isolés à partir de l'"extrait total" ou de la "phase organique" en adaptant les conditions précédentes à la chromatographie préparative: appareil Varian-Aerograph 705 (type Autoprep); colonnes de métal (0.92 × 600 cm) remplies de Chromosorb W-HMDS ("mesh" 100-120) à 3 % de Carbowax 6000; température de la colonne 195°, de l'injecteur 210°, du détecteur 200° et du collecteur 135°; débit du gaz vecteur (azote) 220 ml/min; décomposition de l'effluent vers le détecteur 20 ml/min et vers le collecteur 200 ml/min; sensibilité 1/32; volume injecté à chaque opération, manuellement ou automatiquement, 200 μ l d'une solution méthanolique à 7 % (p/v) de l'"extrait total" ou de la "phase organique". Les fractions sont recueillies dans des tubes refroidis dans la glace.

Dans ces conditions expérimentales, les 2,3,4- et 3,4,6-tri-O-méthyl dérivés possèdent le même comportement chromatographique et il est nécessaire de soumettre

le mélange préalablement triméthylsilylé selon le procédé classique de SWEELEY *et al.*³ à une seconde chromatographie préparative en phase gazeuse. Celle-ci est réalisée dans les conditions décrites ci-dessus aux modifications près suivantes: température de la colonne 175°, de l'injecteur 180°, du détecteur 185° et du collecteur 90°; volume injecté 200 μ l d'une solution à 4.5 % (p/v) de triméthylsilyl-dérivés dans l'heptane. On peut ensuite éliminer le radical triméthylsilyl en maintenant à l'ébullition à reflux, pendant 8 h, une solution à 0.1 % (p/v) des composés dans un mélange à parties égales de méthanol et d'eau, puis en évaporant la solution à siccité sous pression réduite (HEDGLEY ET OVEREND⁴).

Identification des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside

La plupart des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse ont pu être identifiés en comparant leur comportement en chromatographie analytique en phase gazeuse avec celui d'éthers qui avaient pu être préparés par synthèse ou à partir d'oligosaccharides. En outre, la position des groupements méthoxylés a été confirmée ou déterminée, dans le cas de trois éthers diméthyliques dont nous ne possédions pas les composés de référence, par oxydation périodique et par des réactions spécifiques appliquées aux éthers méthyliques du D-mannose après une chromatographie sur papier.

Préparation d'éthers méthyliques témoins de l' α -méthyl-D-mannoside. L' α -méthyl-2,3,4,6-tétra-O-méthyl-D-mannoside a été obtenu par trois cycles de méthylation de l' α -méthyl-D-mannoside suivant HAKOMORI⁵. Les dérivés 2,3,4-, 2,3,6-, et 3,4,6-tri-O-méthylés ainsi que les dérivés 2,3- et 4,6-di-O-méthylés étaient des produits de synthèse préparés par G. Takerkart. Une solution témoin renfermant le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl, les 2,4,6- et 3,4,6-tri-O-méthyl ainsi que le 3,4-di-O-méthyl-dérivé de l' α -méthyl-D-mannoside a été obtenue par méthanolyse d'un perméthylmannane de Levure (KOCOUREK ET BALLOU⁶) fourni par M. MASLER et perméthylé par trois cycles de méthylation selon le procédé de HAKOMORI⁵.

Oxydation périodique. Les éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside ont été oxydés par l'acide périodique suivant le mode opératoire de GLICK *et al.*⁷ à raison de 1 μ mole de composé par ml de solution oxydante. L'oxydation a été suivie pendant 24 h par mesure de la diminution de l'absorbance à 310 nm.

Chromatographie sur papier des éthers méthyliques du D-mannose. Les éthers méthyliques des α -méthyl-D-mannosides sont d'abord soumis à une hydrolyse chlorhydrique (100 μ l d'acide chlorhydrique 1.5 N par mg de composé; 1.5 h à 100°). Les hydrolysats sont ensuite purifiés par un passage sur une colonne d'échangeur d'anions (Duolite A-102 D; "mesh" 25-50; HCO₂⁻). La fraction effluente à laquelle on joint les eaux de lavage des colonnes est évaporée à siccité sous pression réduite. Elle est enfin analysée par chromatographie sur papier Whatman No. 1 dans le système-solvant *n*-butanol-éthanol-eau (5:1:4) de HIRST ET JONES⁸ (durée de la chromatographie; 26 h). La révélation des éthers méthyliques est effectuée à l'aide des réactifs suivants: (1) réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE⁹; (2) réactif à la diméthylaniline de HOUGH *et al.*¹⁰ spécifique des monosaccharides dont l'hydroxyle en C-4 est libre; (3) réactif au chlorure de triphényltétrazolium de WALLENFELS¹¹ spécifique des monosaccharides dont l'hydroxyle en C-2 est libre.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chromatographie analytique

À la suite de nombreux essais que nous avons effectués, le Chromosorb W-AW-HMDS à 3% de Carbowax 6000 nous a fourni la meilleure résolution des dérivés di-, tri- et tétraméthylés de l' α -méthyl-D-mannoside. L'examen de la Fig. 1A et du Tableau I montre, en effet, que ce support permet d'identifier en une seule

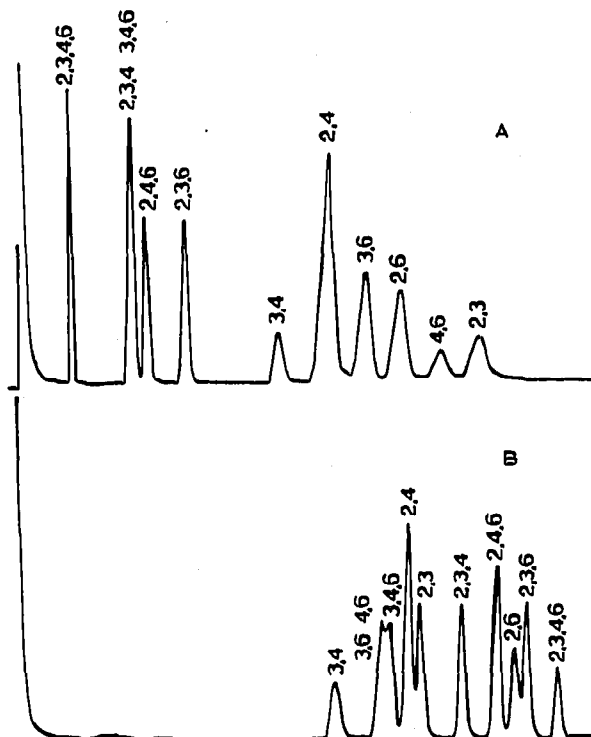


Fig. 1. Chromatographie analytique en phase gazeuse des dérivés tétra-, tri- et diméthylés de l' α -méthyl-D-mannoside avant (A) et après (B) triméthylsilylation.

TABLEAU I

TEMPS DE RÉTENTION DES ÉTHERS DI- ET TRIMÉTHYLIQUES DE L' α -MÉTHYL-D-MANNOSE DÉTERMINÉS PAR RAPPORT AU 2,3,4,6-TÉTRA-O-MÉTHYL- α -MÉTHYL-D-MANNOSE

Nature des éthers méthyliques	Temps relatifs de rétention
2,3,4,6-Tétra-O-méthyl	1
2,3,4-Tri-O-méthyl	2.31
3,4,6-Tri-O-méthyl	2.31
2,4,6-Tri-O-méthyl	2.71
2,3,6-Tri-O-méthyl	3.67
3,4-Di-O-méthyl	5.78
2,4-Di-O-méthyl	7.27
3,6-Di-O-méthyl	8.38
2,6-Di-O-méthyl	9.29
4,6-Di-O-méthyl	10.61
2,3-Di-O-méthyl	11.49

analyse les éthers méthyliques précédents à l'exception des 2,3,4- et 3,4,6-tri-O-méthyl-dérivés dont les temps de rétention sont absolument identiques. Toutefois, comme le démontre la Fig. 1B et le Tableau II, ces deux éthers peuvent être identifiés sous la forme de leur dérivés triméthylsilylés.

L'application de notre procédé à l'analyse de la "phase aqueuse" et de la "phase organique" obtenues après le traitement par l'eau de la solution chloroformique

TABLEAU II

TEMPS DE RÉTENTION DES DÉRIVÉS TRIMÉTHYLSILYLÉS DES ÉTHERS DI- ET TRIMÉTHYLIQUES DE L' α -MÉTHYL-D-MANNOSE DÉTERMINÉS PAR RAPPORT AU 2,3,4,6-TÉTRA-O-MÉTHYL- α -MÉTHYL-D-MANNOSE

<i>Nature des composés</i>	<i>Temps relatifs de rétention</i>
2,3,4,6-Tétra-O-méthyl	1
4-TMS-2,3,6-tri-O-méthyl	0.946
3,4-TMS-2,6-di-O-méthyl	0.922
3-TMS-2,4,6-tri-O-méthyl	0.890
6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl	0.829
4,6-TMS-2,3-di-O-méthyl	0.752
3,6-TMS-2,4-di-O-méthyl	0.729
2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl	0.693
2,4-TMS-3,6-di-O-méthyl	0.681
2,3-TMS-4,6-di-O-méthyl	0.681
2,6-TMS-3,4-di-O-méthyl	0.596

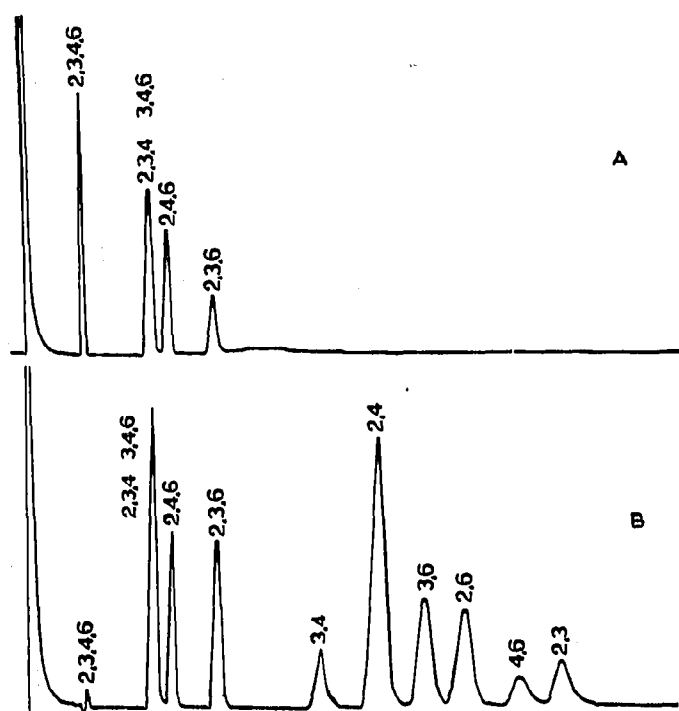


Fig. 2. Chromatographie analytique en phase gazeuse des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside présents dans la "phase chloroformique" (A) et dans la "phase aqueuse" (B).

des dérivés méthylés de l' α -méthyl-D-mannoside révèle que ce procédé réalise un fractionnement sélectif tout à fait relatif. En effet, la Fig. 2 montre que, si le dérivé tétraméthylé se trouve en totalité dans la phase chloroformique et les éthers diméthyliques dans la phase aqueuse, les dérivés triméthylés se répartissent, au contraire, dans les deux phases. Ce procédé de fractionnement ne peut donc en aucun cas être appliqué à l'analyse des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside présent dans les méthanolysats de glycannes.

Chromatographie préparative

La chromatographie analytique en phase gazeuse des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside telle que nous l'avons décrite dans le paragraphe précédent a été adaptée à la chromatographie préparative. Les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante:

(1) La chromatographie préparative de l'extrait total (rendement: 9,5 g à partir de 8 g d' α -méthyl-D-mannoside) fournit, pour chaque injection de 14 mg d'extrait total, des quantités d'éthers méthyliques purs (Fig. 3) qui correspondent à un rendement final de 96 % (voir le Tableau III).

(2) La chromatographie préparative (Fig. 4A) de 9 mg du mélange des 2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl- et 6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl- α -méthyl-D-mannosides fournit 2,73 mg du premier et 4,48 mg du second composé.

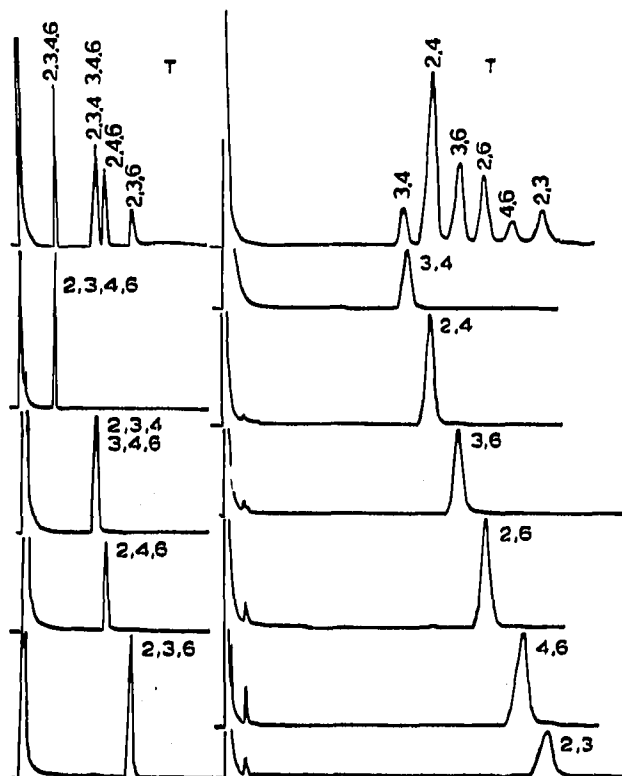


Fig. 3. Chromatographie en phase gazeuse des dérivés tétra-, tri- et diméthylés isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse. T = Mélanges témoins.

Le traitement à chaud par le méthanol aqueux des quantités précédentes des TMS-dérivés conduit finalement à l'isolement (Fig. 4B) de 2.3 mg de 3,4,6-tri-O-méthyl- α -méthyl-D-mannoside et de 3.77 mg de 2,3,4-tri-O-méthyl- α -méthyl-D-mannoside.

TABLEAU III

POIDS D'ÉTHERS MÉTHYLIQUES OBTENUS PAR CHROMATOGRAPHIE PRÉPARATIVE EN PHASE GAZEUSE À PARTIR DE 14 mg D'"EXTRAIT TOTAL"

Nature des éthers méthyliques	Quantité mg
2,3,4,6-Tétra-O-méthyl	1.2
2,3,4-Tri-O-méthyl + 3,4,6-Tri-O-méthyl	1.0
2,3,6-Tri-O-méthyl	0.65
2,4,6-Tri-O-méthyl	1
2,3-Di-O-méthyl	0.96
2,4-Di-O-méthyl	3.2
2,6-Di-O-méthyl	1.48
3,4-Di-O-méthyl	0.87
3,6-Di-O-méthyl	1.05
4,6-Di-O-méthyl	0.57

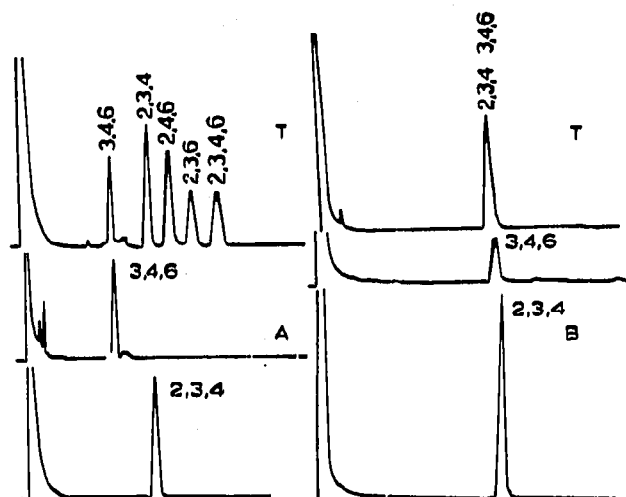


Fig. 4. Chromatographie en phase gazeuse des 2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl- et 6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl- α -méthyl-D-mannosides (A) et des 3,4,6-tri-O-méthyl- et 2,3,4-tri-O-méthyl- α -méthyl-D-mannosides (B) obtenus par traitement des TMS-dérivés précédents par le méthanol aqueux à l'ébullition. T = mélanges témoins.

(3) L'isolement du tétraméthyl et des quatre triméthyl-dérivés de l' α -méthyl-D-mannoside peut encore être réalisé à partir de la "phase organique" (3 g pour 9.5 g d'extrait total) préalablement triméthylsilylée. En effet, comme le montrent la Fig. 4A et la Tableau II, la chromatographie en phase gazeuse sur Chromosorb W-AW-HMDS à 3% de Carbowax 6000 fournit d'excellentes résolutions des cinq composés précédents. Les quantités obtenues pour chaque injection de 9 mg de "phase organique" triméthylsilylée se trouvent dans le Tableau IV.

On obtient finalement, après dé-triméthylsilylation, les quantités d'éthers triméthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside données dans le Tableau V.

TABLEAU IV

POIDS D'ÉTHERS MÉTHYLIQUES OBTENUS PAR CHROMATOGRAPHIE PRÉPARATIVE EN PHASE GAZEUSE À PARTIR DE 9 mg DE "PHASE ORGANIQUE"

Nature des éthers méthyliques	Quantité (mg)
2,3,4,6-Tétra-O-méthyl	1.09
2-TMS-3,4,6-tri-O-méthyl	1.25
3-TMS-2,4,6-tri-O-méthyl	1.81
4-TMS-2,3,6-tri-O-méthyl	1.07
6-TMS-2,3,4-tri-O-méthyl	2.1

TABLEAU V

POIDS D'ÉTHERS MÉTHYLIQUES OBTENUS PAR DÉ-TRIMÉTHYLSILYLATION DES QUANTITÉS DE TMS-DÉRIVÉS PRÉCISÉES DANS LE TABLEAU IV

Nature des éthers méthyliques	Quantité (mg)
3,4,6-Tri-O-méthyl	1.05
2,4,6-Tri-O-méthyl	1.52
2,3,6-Tri-O-méthyl	0.9
2,3,4-Tri-O-méthyl	1.7

Identification des éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside

Les éthers méthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside suivants ont été identifiés en comparant leur comportement chromatographique avec celui des composés de référence obtenus par synthèse organique ou préparés à partir de polysaccharides: 2,3,4,6, 2,3,4, 2,4,6, 2,3,6, 3,4,6, 2,3, 3,4 et 4,6. En outre, la nature des éthers méthyliques précédents a été confirmée par l'emploi des réactifs spécifiques des fonctions OH libres en C-2 ou en C-4 appliqués après chromatographie sur papier.

Ce dernier procédé, associé à l'oxydation périodique, nous a permis d'identifier les éthers diméthyliques 2,4, 2,6 et 3,6 de l' α -méthyl-D-mannoside dont nous ne possédions pas les produits de référence: la consommation d'acide périodique par ces trois dérivés isolés par chromatographie préparative en phase gazeuse a été respectivement de 0, 1 et 0 mole; les 2,4- et 3,6-dérivés ont été discriminés par le chlorure de triphényltétrazolium et par la N-diméthylaniline (réactions négatives pour le premier et positives pour le second).

CONCLUSIONS

La chromatographie en phase gazeuse analytique sur colonne de Chromosorb W-AW-HMDS contenant 3% de Carbowax 6000 permet d'identifier en une seule étape les éthers tétra-, tri- et diméthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside à l'exception des 2,3,4- et 3,4,6-tri-O-méthyl éthers qui peuvent toutefois être séparés, dans un second temps, à l'aide d'une colonne identique sous la forme de leurs dérivés triméthylsilylés. Les éthers méthyliques ainsi analysés ont pu être préparés rapidement et avec de bons rendements, en adaptant les conditions de la chromatographie analytique à la chromatographie préparative. Cette étude prélude à la description des propriétés physico-chimiques et à l'analyse quantitative par chromatographie en phase gazeuse de ces éthers méthyliques.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos vifs remerciements au Professeur M. MASLER de Bratislava qui nous a fourni un échantillon de mannane de Levure, à Monsieur G. TAKERKART qui a synthétisé les 2,3-, 4,6-, 2,3,4-, 2,3,6- et 3,4,6-méthyl-dérivés du D-mannose et à Monsieur YVES LEROY pour sa précieuse collaboration technique. Ce travail a été subventionné par le Centre National de la Recherche Scientifique (Équipe de Recherche Associée No. 320: Structure et métabolisme des glycoprotéines).

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent un procédé de chromatographie en phase gazeuse analytique et préparatif des éthers di-, tri- et tétraméthyliques de l' α -méthyl-D-mannoside obtenus par méthylation partielle de l' α -méthyl-D-mannoside. L'emploi de colonnes de Chromosorb W-AW-HMDS à 3% de Carbowax 6000 permet de séparer et d'isoler tous les dérivés di-, tri- et tétraméthylés de l' α -méthyl-D-mannoside à l'exception des 2,3,4- et 3,4,6-tri-O-méthyl-dérivés qui peuvent toutefois être identifiés et isolés, dans un second temps, sous la forme de leurs dérivés triméthylsilylés et sur le même type de colonnes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 N. HANDA ET R. MONTGOMERY, *Carbohydr. Res.*, 11 (1969) 467.
- 2 R. L. WHISTLER ET M. L. WOLFROM, *Methods Carbohydr. Chem.*, 2 (1963) 146.
- 3 C. C. SWEELEY, R. BENTLEY, M. MAKITA ET W. W. WELLS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 4 E. J. HEDGLEY ET W. G. OVEREND, *Chem. Ind. (London)*, (1960) 378.
- 5 S. HAKOMORI, *J. Biochem.*, 55 (1964) 205.
- 6 J. KOCOUREK ET C. E. BALLOU, *J. Bacteriol.*, 100 (1969) 1175.
- 7 M. C. GLICK, I. W. CHEN ET F. ZILLIKEN, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 981.
- 8 E. L. HIRST ET J. K. N. JONES, *Chromatographic Analysis*, A discussion of the Faraday Society, 1949, p. 248.
- 9 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. Soc. Symp.*, 3 (1949) 52.
- 10 L. HOUGH, J. K. N. JONES ET W. H. WADMAN, *J. Chem. Soc.*, (1950) 1702.
- 11 K. W. WALLENFELS, *Naturwissenschaften*, 37 (1950) 491.