

CHROM. 8624

SÉPARATION DES ALDOSES ET DES POLYSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DE CELLULOSE ET NOUVEAU RÉACTIF DE PULVÉRISATION PERMETTANT LEUR RÉVÉLATION SENSIBLE

M. HOTON-DORGE

Institut de Pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles, Service de Pharmacognosie et de Pharmacie Galénique, Boulevard du Triomphe, Bruxelles (Belgique)

(Reçu le 13 mai 1975; manuscrit modifié reçu le 21 juillet 1975)

SUMMARY

Separation of aldoses and polysaccharides by cellulose thin-layer chromatography and a new spray reagent for the sensitive detection of these carbohydrates

An easy and rapid method for the separation of mono- and polysaccharides by cellulose thin-layer chromatography is described. A sensitive, differentiated and simultaneous detection of these carbohydrates is realized.

INTRODUCTION

L'identification des sucres par chromatographie sur papier et en couche mince a été réalisée depuis longtemps. Il faut cependant reconnaître que si la chromatographie sur papier reste une méthode à laquelle on a souvent recours, et les travaux de Montreuil¹ sont une référence en la matière, son usage ne permet de séparer qu'un nombre limité de sucres à la fois, les temps d'éluion sont extrêmement longs (8-24 h) et les spots parfois difficilement interprétables.

En revanche, les techniques de chromatographie en couche mince, avec un matériel peu encombrant, fournissent des résultats rapides et offrent des possibilités analytiques variées. Or la plupart des travaux publiés concernent la séparation d'un nombre limité de sucres²⁻⁶, exception faite des travaux de Mezzetti *et al.*⁷ et de Ghebregziabhier *et al.*⁸, qui montrent avec éloquence, les résultats que l'on peut obtenir par la chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur des supports variés. Cependant, les conditions de réalisation des techniques utilisées exigent une dextérité peu compatible avec des travaux de routine. Récemment Hansen⁹ a réalisé, la séparation de mono-, di- et trisaccharides par chromatographie sur couche mince de silica gel.

La méthode que nous proposons réunit la rapidité, la simplicité et l'efficacité, puisque nous parvenons à séparer de façon satisfaisante les principaux aldoses et polysaccharides par une seule et même technique. En effet, nous utilisons la chroma-

tographie monodimensionnelle en couche mince de cellulose, et la révélation des sucres est assurée par un réactif original destiné à détecter simultanément et de façon différenciée les polysaccharides et les monoses. Utilisé dans des conditions bien précises, ce réactif s'avère particulièrement sensible. Les réactions colorées sont visibles à partir de concentrations de l'ordre du μg .

Nous réalisons l'identification des aldoses et des polysaccharides suivants :

Aldohexoses: D-galactose, D-glucose et D-mannose

Aldopentoses: D-arabinose, D-xylose et D-ribose

Aldométhylpentoses: D-fucose et L-rhamnose

Disaccharides: maltose, lactose et saccharose

Trisaccharide: raffinose

Tétrasaccharide: stachyose

PARTIE EXPÉRIMENTALE ET RÉSULTATS

Préparation des plaques de cellulose

15 g de cellulose 300 MN de Macherey, Nagel et Cie. (Düren, Allemagne fédérale) sont mis en suspension dans 100 ml d'eau. La suspension est agitée mécaniquement pendant 15 min, puis répartie sur quatre plaques de verre 20×20 cm. Les plaques sont séchées à température du laboratoire pendant une nuit et ne nécessitent pas d'être activées avant usage. De plus, ces couches de cellulose se conservent de nombreuses semaines, pourvu qu'elles soient mises à l'abri des souillures.

Concentration des témoins

La concentration des solutions témoins de sucre est de 1 mg par ml dans l'éthanol à 70°. Dépôt des témoins: 5 λ de ces solutions (5 μg).

Solvants d'éluion

Les solvants d'éluion utilisés, le nombre et le temps de développements se trouvent dans le Tableau I.

TABLEAU I

SOLVANTS D'ÉLUION UTILISÉS, NOMBRE ET TEMPS DE DÉVELOPPEMENTS

No.	Solvants d'éluion	Temps de développement (h)	Nombre de développements
1	Acétate d'éthyle-pyridine-eau-n-butanol-acide acétique (5:4:4:10:2)	2	2
2	n-Butanol-acide acétique-eau (5:1:2)	4	1
3	Solvant No. 1 + 5% d'eau	2.5	1

Révélation des chromatogrammes

Tous les réactifs que l'on emploie généralement pour révéler les sucres après chromatographie sur papier, peuvent être utilisés pour détecter ces derniers après chromatographie sur couche mince de cellulose.

Citons le réactif très sensible mais peu spécifique au nitrate d'argent de Trevelyan *et al.*¹⁰. En effet, il est positif avec toutes les substances réductrices.

Les réactifs à la *p*-anisidine, à la benzidine ou à la diphenylamine sont très couramment utilisés. Cependant, leur emploi ne nous paraît pas satisfaisant. En effet, tous les oses donnent la même coloration et leur sensibilité n'est pas extraordinaire. D'autre part, il faut signaler l'emploi peu indiqué de ces réactifs, étant donné le caractère cancérigène de la benzidine et de la diphenylamine.

Les différents réactifs aux sels d'aniline, tous également cancérigènes, ont aussi été expérimentés (phtalate, citrate, oxalate et phosphate). Le plus sensible est le réactif au phosphate d'aniline de Hough *et al.*¹¹, modifié par Frahn et Mills¹². Les colorations obtenues sont relativement bien différenciées, mais subissent une décoloration assez rapide.

Citons enfin l'acide *p*-aminohippurique, utilisé pour la première fois par Sattler¹³ comme réactif de révélation des monoses réducteurs, des disaccharides réducteurs tels le maltose et le lactose et des polysaccharides non réducteurs facilement hydrolysés, tels le saccharose et le raffinose, après leur chromatographie sur papier. Cependant, dans les conditions de révélation proposées par l'auteur, les oses se révèlent de façon peu contrastée.

Appliqué à la couche mince de cellulose, ce réactif s'avère très sensible et fournit des colorations stables, différentes pour chaque groupe d'aldoses, à condition toutefois de ne pas exposer les chromatogrammes à une température supérieure à 90°.

D'autre part, des réactions plus sensibles ont été obtenues en utilisant l'acide *p*-aminohippurique en milieu acide phosphorique plutôt qu'en présence d'acide phtalique préconisé par Sattler.

Réactif I. Nous proposons quant à nous, la formule suivante pour le réactif I: acide *p*-aminohippurique (BDH, Poole, Grande-Bretagne)-acide phosphorique-éthanol à 80° (0.3 g:0.5 ml:100 ml).

Après avoir séché les chromatogrammes à la température du laboratoire, ils sont imprégnés par pulvérisation avec 15 ml du réactif I et maintenus 20 min dans une étuve à 80°.

Dans ces conditions, les différents groupes d'aldoses fournissent des teintes vives, stables et différenciées. Les aldohexoses apparaissent en jaune avec fluorescence jaune en lumière ultraviolette à 350 nm, et les aldopentoses en rouge avec fluorescence rouge en lumière ultraviolette. Les aldométhylpentoses se colorent en jaune comme les aldohexoses, mais leur fluorescence en ultraviolet à 350 nm est jaune ocre. Les disaccharides apparaissent en jaune avec fluorescence jaune en lumière ultraviolette à 350 nm, comme les aldohexoses. La révélation des tri- et tetrasaccharides est obtenue en portant les chromatogrammes 30 min à 100°. Cependant, à cette température, la différenciation des aldoses par leur réaction colorée est compromise.

D'autre part, lors de l'étude des limites de sensibilité de ce réactif I avec les différents oses, on constate que si ce réactif révèle des quantités d'aldoses inférieures au μg , il est moins sensible pour les polysaccharides, surtout pour les tri- et tetrasaccharides (voir le Tableau II).

Le réactif de Percheron¹⁴, à base d'acide thiobarbiturique et d'acide phosphorique, détecte la plupart d'entre eux. Il révèle de façon spécifique, uniquement les cétohexoses et les polysaccharides contenant du fructose. Percheron a également démontré qu'il s'agissait d'une réaction furfuralique sensible uniquement avec les

TABLEAU II
 COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE MONO- ET POLYSACCHARIDES SUR COUCHE MINCE DE CELLULOSE DANS DIFFÉRENTS SYSTÈMES DE SOLVANTS ET RÉACTIONS COLORÉES AU MOYEN DE DEUX NOUVEAUX RÉACTIFS

Oxyes	Réactions colorées au moyen des réactifs						Limite de sensibilité des réactifs I et II (μg)			
	Valeur des R_f pour les systèmes de solvants		No. 1		No. II		No. I		No. II	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 1	Visible	UV 350 nm	Visible	UV 350 nm	Visible	UV 350 nm
<i>Aldométhylpentoses</i>										
L-Rhamnose	0.72	0.58	0.53	jaune	jaune paille	jaune-vert	0.5	0.1	1	1
D-Fucose	0.60	0.50	0.44	jaune	jaune pâle	jaune-vert	0.5	0.1	1	1
<i>Aldopentoses</i>										
D-Ribose	0.64	0.48	0.46	rouge	vert	orange	0.25	0.1	0.5	5
D-Xylose	0.55	0.46	0.40	rouge	vert	sombre	0.25	0.1	1	5
D-Arabinose	0.50	0.41	0.35	rouge	vert	orange	0.25	0.1	0.5	5
<i>Cétolhexose</i>										
Fructose	0.48	0.40	0.34	jaune	orange	brun-rouge	10	5	0.25	0.25
<i>Aldohexoses</i>										
D-Mannose	0.46	0.39	0.34	jaune	orange	jaune	0.25	0.1	0.5	0.25
D-Glucose	0.42	0.34	0.30	jaune	orange	orange	0.25	0.1	0.5	0.5
D-Galactose	0.36	0.30	0.27	jaune	orange	jaune vif	0.25	0.1	0.5	0.25
<i>Disaccharides</i>										
Saccharose	0.32	0.27	0.24	jaune	orange	jaune-brun	2.5	1	0.25	0.25
Maltose	0.25	0.22	0.20	jaune	orange	jaune-brun	2.5	1	0.25	0.25
Lactose	0.20	0.18	0.15	jaune	orange	jaune-orange	1	0.5	0.25	0.25
<i>Trisaccharide</i>										
Raffinose	0.12	0.13	0.12	jaune	orange	jaune-brun	5	2.5	0.25	0.25
<i>Tétrasaccharide</i>										
Stachyose	0.04	0.06	0.06	jaune	orange	jaune-brun	10	5	0.25	0.25

cétoses dans les conditions qu'il propose. De plus, Drozd¹⁵ a déjà signalé un procédé de différenciation du xylose et de l'arabinose par un réactif à l'acide thiobarbiturique en milieu acide acétique.

Réactif II. Nous avons quant à nous, réalisé un réactif (réactif II) de grande sensibilité en incorporant au réactif I (à l'acide *p*-aminohippurique) de l'acide thiobarbiturique. La composition finale du nouveau réactif a été arrêtée aux proportions suivantes: acide *p*-aminohippurique (BDH)-acide thiobarbiturique (Fluka, Buchs, Suisse)-acide phosphorique-éthanol à 65° (0.15 g:0.25 g:1 ml:100 ml).

Les chromatoplaques séchés à la température du laboratoire, puis imprégnés par pulvérisation avec 15 ml de ce dernier mélange, doivent séjourner 20 min dans une étuve à 110°.

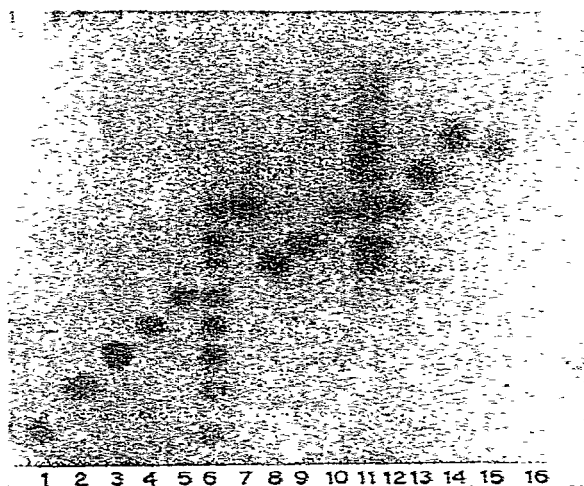


Fig. 1. Chromatographie sur couche mince de cellulose des aldoses et polysaccharides. Solvant, acétate d'éthyle-pyridine-eau-*n*-butanol-acide acétique (5:4:4:10:2); Révélation, réactif II à base d'acide thiobarbiturique et d'acide *p*-aminohippurique. 1 = Stachyose; 2 = raffinose; 3 = lactose; 4 = maltose; 5 = saccharose; 6 = mélange témoins 1-5 et sucres constitutifs 7-9; 7 = fructose; 8 = galactose; 9 = glucose; 10 = mannose; 11 = mélange témoins 8-10, 12-16; 12 = arabinose; 13 = xylose; 14 = ribose; 15 = fucose; 16 = rhamnose.

Ce réactif s'avère d'un grand intérêt. En effet, en lumière visible, tous les polysaccharides examinés (stachyose, raffinose, lactose, maltose et saccharose), leurs monoses constitutifs (galactose, glucose et fructose) ainsi que les aldohexoses, se révèlent en jaune orangé. Les aldopentoses se révèlent en vert et les méthylaldopentoses en jaune pâle (voir Fig. 1). L'examen en lumière ultraviolette à 350 nm permet des différenciations plus nombreuses (voir Tableau II), notamment dans un même groupe de sucres. Par exemple, le xylose par rapport à l'arabinose et au ribose (aldopentoses), ou le glucose et le mannose par rapport au galactose (aldohexoses), ou encore la fluorescence brun rouge caractéristique du fructose (cétohexose). Il est à remarquer que les cétooses libres et conjugués apparaissent déjà après un séjour de 10 min dans l'étuve à 110°.

CONCLUSION

Nous avons réuni dans le Tableau II, les R_F des aldoses et des polysaccharides séparés par chromatographie en couche mince de cellulose avec les solvants d'éluion que nous proposons. Les colorations déterminées avec ces différents oses en lumière visible et ultraviolette, par l'utilisation de deux nouveaux réactifs, y sont également indiquées, ainsi que la limite de sensibilité de ces réactifs.

De la comparaison des comportements chromatographiques de ces sucres avec les différents mélanges d'éluion proposés, on peut conclure que l'éluant de choix est le solvant 1 qui réalise leur séparation de manière indiscutable. Par contre, les solvants 2 et 3, convenant parfaitement pour la séparation des polysaccharides, fournissent des valeurs de R_F quasi identiques pour le mannose et l'arabinose, alors qu'ils séparent bien les autres aldoses.

En ce qui concerne les réactifs de révélation, on peut affirmer que le réactif II, constitué par un mélange original à base d'acide *p*-aminohippurique et d'acide thio-barbiturique, est le plus intéressant. Il dépasse en sensibilité et spécificité les réactifs généralement utilisés pour révéler les sucres sur papier ou sur cellulose. En effet, il détecte simultanément tous les polysaccharides et les aldoses, en faisant apparaître des colorations différenciées de ces oses à partir de concentrations de l'ordre du μg , et cela dans des conditions de température bien précises. Avec ce réactif, l'examen des fluorescences en lumière ultraviolette à 350 nm fournit d'autres indications, par exemple, la différenciation des aldopentoses entre eux, et des aldohexoses entre eux. Si, à part le lactose, les polysaccharides présentent une fluorescence identique, leurs produits d'hydrolyse déterminent une fluorescence différente. En effet, le fructose est fluorescent en rouge brun, le galactose en jaune vif et le glucose en orange. Tous ces résultats permettent de confirmer des identifications déjà obtenues par les valeurs des R_F de ces différents sucres.

Cependant, on remarque que le réactif I, à base d'acide *p*-aminohippurique, est plus sensible que le réactif II pour la révélation des aldohexoses. En effet, il est possible de détecter des quantités d'aldohexoses de l'ordre du 0.1 μg (voir Tableau II).

RÉSUMÉ

Une méthode simple et rapide permettant de séparer par chromatographie en couche mince de cellulose quelques aldoses et polysaccharides a été mise au point. La révélation sensible, différenciée et simultanée de tous ces oses a également été réalisée.

REMERCIEMENT

Je remercie M. de Wächter pour sa collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Montreuil et G. Spik, *Monographies du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille*, No. 2, 1963, p. 69.
- 2 W. Kamp et A. van Oort, *Pharm. Weekbl.*, 102 (1967) 1295.
- 3 S. Hakomori et R. W. Jeanloz, communication personnelle.

- 4 A. Schweiger, *J. Chromatogr.*, 9 (1962) 374.
- 5 E. Ragazzi et G. Veroneze, *Farmaco (Pavia)*, 18 (1963) 1952.
- 6 D. Waldi, *J. Chromatogr.*, 18 (1965) 417.
- 7 T. Mezzetti, M. Ghebregziabhier, S. Rufini, G. Ciuffini et M. Lato, *J. Chromatogr.*, 74 (1972) 273.
- 8 M. Ghebregziabhier, S. Rufini, G. Ciuffini et M. Lato, *J. Chromatogr.*, 95 (1974) 51.
- 9 S. A. Hansen, *J. Chromatogr.*, 107 (1975) 224.
- 10 W. E. Trevelyan, D. P. Procter et J. S. Harrison, *Nature (London)*, 166 (1950) 444.
- 11 L. Hough, J. K. N. Jones et W. H. Wadman, *J. Chem. Soc.*, (1950) 1702.
- 12 J. L. Frahn et J. A. Mills, *Austr. J. Chem.*, 12 (1959) 65.
- 13 L. Sattler, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1862.
- 14 F. Percherson, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1965) 255
- 15 B. Drozd, *Nature (London)*, 184 (1959) 1395.