

CHROM. 13,322

SYNTHÈSE DE GLYCOSIDES

DOSAGE DIRECT DES ANOMÈRES PERBENZYLÉS INTERMÉDIAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

M. DREUX* et M. LAFOSSE

Laboratoire de Chimie Organique Physique et Chromatographie, U.E.R. de Sciences Fondamentales et Appliquées, 45046 Orléans Cedex (France)

et

P. H. AMVAM ZOLLO, J. R. PUGNY et P. SINAÏ

Laboratoire de Biochimie Structurale, E.R.A. 739, U.E.R. de Sciences Fondamentales et Appliquées, 45046 Orléans Cedex (France)

SUMMARY

Synthesis of glycosides. Direct high-performance liquid chromatographic determination of intermediate perbenzylated anomers

High-performance liquid chromatography has been used to determine the stereospecificity of the synthesis of α or β glycosides. The protecting groups are benzylic ethers, therefore we have employed reversed-phase liquid chromatography to separate α and β anomers. Some octadecyl supports have been compared, in order to optimize the separation for several glycosides.

INTRODUCTION

La synthèse stéréospécifique de glycosides α ou β est un problème classique en chimie des sucres¹. Il existe de nombreux groupes protecteurs temporaires et récemment nous avons proposé un procédé très stéréosélectif d'accès aux glycosides $\alpha^{2,3}$ qui utilise les éthers benzyliques comme groupement protecteur non participant et les imidates comme groupe activant du carbone anomère.

Par exemple la synthèse de l' α -méthylmaltoside s'effectue avec un excellent rendement selon le schéma en trois étapes de la Fig. 1.

L'intérêt de cette synthèse est multiple:

(a) le passage des glycosides benzylés aux glycosides libres s'effectue sans racémisation et avec de très bons rendements (étape 3, Fig. 1); (b) la présence des noyaux aromatiques permet une détection UV facile et sensible des glycosides benzylés; (c) l'imidate permet l'obtention stéréospécifique des anomères α avec de bons rendements; toutefois, la recherche d'une éventuelle contamination par l'anomère β même en faible proportion est un problème d'importance.

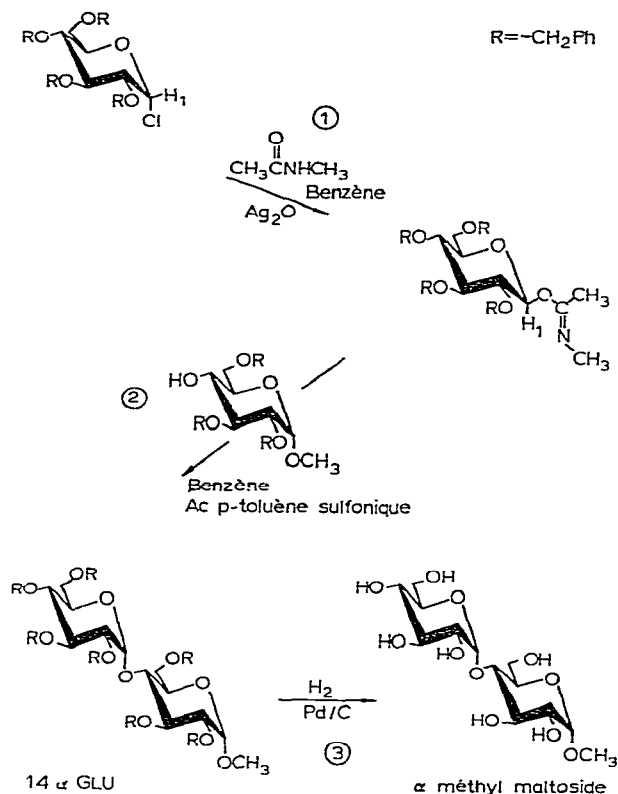


Fig. 1. Schéma de principe de la synthèse de l' α -méthyl-maltoside.

La RMN du proton, le pouvoir rotatoire, la chromatographie sur couche mince ne sont à cet égard pas toujours exploitables. La chromatographie en phase gazeuse permet, au contraire, des dosages précis de faibles quantités d'isomères, de diastéréoisomères et d'isomères optiques⁴. Dans le cas de ces molécules possédant plusieurs noyaux aromatiques, il est alors nécessaire d'effectuer une transformation en produits débenzylés que l'on silyle. Ces manipulations intermédiaires peuvent ne pas être quantitatives ce qui hypothèque alors sur la précision du dosage⁵.

Nous proposons ici un dosage rapide, direct et précis des anomères α et β par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) en phases inversées (phases greffées apolaires). Le dosage de glycosides a déjà été proposé par HPLC^{6,7}: il utilise, compte tenu de la difficulté de détection des sucres libres, la formation de dérivés esters benzoïques facilement détectables en UV et des phases polaires (silice, alumine).

Depuis l'apparition des phases apolaires ce système est de choix pour la chromatographie de molécules possédant des noyaux aromatiques⁸; il a l'avantage d'une reproductibilité et d'une stabilité des supports supérieures aux phases polaires précédemment citées.

PARTIE EXPERIMENTALE

L'appareil utilisé est un chromatographe Waters (Waters Assoc., Milford, MA

U.S.A.) équipé d'une pompe 6000 A, d'un détecteur UV à filtre modèle 440. Pour réaliser une double détection nous avons employé un réfractomètre différentiel Waters R.401, placé après le détecteur UV, l'enregistrement est réalisé sur un appareil à double voie Vitatron 2001 (Vitatron, Malakoff, France).

Les colonnes (15 cm × 6.4 mm O.D.) sont remplies avec des silices greffées de granulométrie 5 et 7 μm : (a) LiChrosorb RP-18, 5 μm (Merck, Darmstadt, R.F.A.); (b) Nucleosil 5 C₁₈, 5 μm (Macherey Nagel, Düren, R.F.A.); (c) Spherosil XOA-600 C₁₈, 7 μm (Prolabo, Paris, France); et (d) Zorbax ODS 7 μm (DuPont, Wilmington, DE, U.S.A.). Le remplissage s'effectue à l'aide d'une suspension de la phase greffée dans le tétrachlorure de carbone puis percolation sous 400 bars avec le triméthyl-2,2,4 pentane.

Les éluants sont constitués de mélange d'eau distillée et de méthanol (Rathburn Chemicals, Walkerburn, Grande-Bretagne). Les proportions sont indiquées en volume.

Les produits analysés ont été synthétisés au laboratoire^{2,3} et mis en solution dans le chlorure de méthylène.

Méthyl-2,3,6-tri-O-benzyl-4-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside = 1,4 α Glu; méthyl-2,3,6-tri-O-benzyl-4-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside = 1,4 β Glu; méthyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside = 1,6 α Glu; méthyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside = 1,6 β Glu; (2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl)-2,3,4,6-tétra-O-benzyl- β -D-glucopyranoside = 1,1 $\alpha\beta$ Glu; (2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl)-2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranoside = 1,1 $\alpha\alpha$ Glu; (2,3,4,6-tétra-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl)-2,3,4,6-tétra-O-benzyl- β -D-glucopyranoside = 1,1 $\beta\beta$ Glu.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les isomères, quelles que soient les phases greffées, sont facilement séparés (Tableau I). Les anomères quant à eux nécessitent parfois le choix approprié du support octadécyl et la composition de la phase éluante.

TABLEAU I

RÉTENTION RELATIVE D'ANOMÈRES α ET β EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASES INVERSÉES (ÉLUANT MÉTHANOL-EAU, 95:5) SUR DIFFÉRENTS SUPPORTS GREFFÉS OCTADÉCYL

Solutés	LiChrosorb RP-18	Nucléosil C ₁₈	Sphérosil C ₁₈	Zorbax ODS
1,4 α Glu	1	1	1	1
1,4 β Glu	1.15	1.07	1.07	1.13
1,6 α Glu	1.20	1.10	1.07	1.16
1,6 β Glu	1.20	1.10	1.07	1.16
1,1 $\alpha\alpha$ Glu	1.78	1.46	1.56	1.89
1,1 $\alpha\beta$ Glu	2.12	1.63	1.86	2.29
1,1 $\beta\beta$ Glu	2.27	1.80	2.02	2.43
Volume de rétention (ml) réduit de 1,4 α Glu	8.20	8.20	8.60	11.20

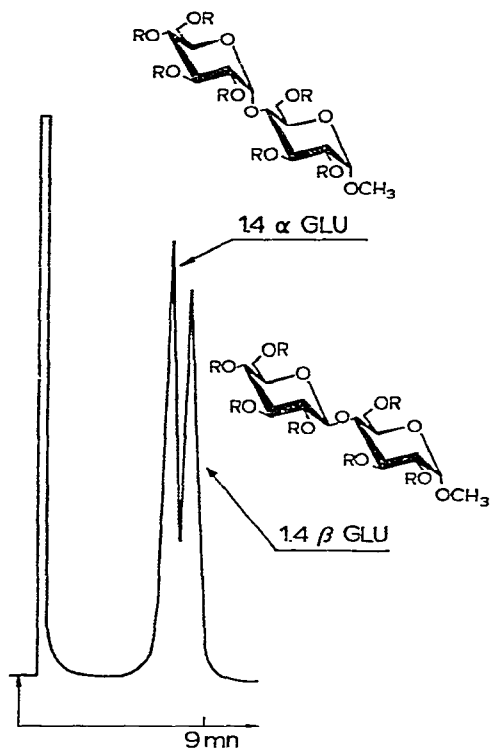


Fig. 2. Séparation du couple d'anomères 1,4 α Glu/1,4 β Glu sur Zorbax C₁₈. Éluant, méthanol-eau (95:5). Débit 2 ml/mn. (R = CH₂-C₆H₅).

Par exemple alors que le couple 1,4 α Glu/1,4 β Glu est facilement séparé (Fig. 2) (méthanol-eau; 95:5) et dosable en quelques minutes seulement (Tableau I), le couple 1,6 α Glu/1,6 β Glu nécessite la phase greffée Zorbax ODS et un éluant méthanol-eau (88:12) pour une analyse beaucoup plus longue (Tableaux I et II). Un même greffon octadécyl sur des silices différentes (sphériques et non sphériques) montre, sur ces exemples, des rétentions et des sélectivités différentes.

TABLEAU II

VOLUME DE RÉTENTION (ml) D'ANOMÈRES α ET β EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASES INVERSÉES

Éluant méthanol-eau	Solutés	LiChrosorb RP-18	Zorbax ODS
88:12	1,6 α Glu	65	126
	1,6 β Glu	65	116
91:9	1,1 $\alpha\beta$ Glu	77.6	172
	1,1 $\beta\beta$ Glu	68.8	153

Des trois supports octadécyl à grains de silice sphérique (Nucléosil, Sphérosil et Zorbax), le Zorbax offre la rétention la plus grande. A rétention pratiquement égale (Zorbax et LiChrosorb), nous trouvons une meilleure sélectivité du grain de forme sphérique (Zorbax) par rapport au grain de forme non sphérique (LiChrosorb).

Quant à la précision du dosage par UV il est lié, la séparation réalisée, à l'hypothèse de l'égalité des coefficients d'extinction moléculaire pour deux anomères à la longueur d'onde de détection 254 nm. Une détection réfractométrique différentielle est également possible et sa sensibilité est bonne: ceci provient sûrement de la présence des groupes benzyles dans les molécules. Si la réponse n'est pas la même pour les deux anomères la précision s'en trouve affectée et c'est pourquoi une double détection UV/réfractométrie différentielle permet un dosage plus précis.

CONCLUSION

La stéréospécificité de cette synthèse, qui donne accès aux glycosides α , est facilement suivie sur les intermédiaires par HPLC en phases inversées.

RÉSUMÉ

La chromatographie en phase liquide à haute performance a été utilisée pour déterminer la stéréospécificité de la synthèse des glycosides α ou β . Comme les groupes protecteurs sont les éthers benzylques, nous avons employé la chromatographie en phases inversées pour séparer les anomères α et β . Différents supports greffés octadécyl ont été comparées, pour optimiser la séparation de certains glycosides.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. F. Bochkov et G. E. Zaikov, *Chemistry of the O-Glycosidic bond: Formation and Cleavage*, Pergamon, Elmsford, 1979.
- 2 J. R. Pougny, J. C. Jacquinet, M. A. M. Nassr, D. Duchet, M. L. Milat et P. Sinaÿ, *J. Amer. Chem. Soc.*, 99 (1977) 6762-6763.
- 3 J. R. Pougny, M. A. M. Nassr, N. Naulet et P. Sinaÿ, *Nouv. J. Chim.*, 2 (1978) 389-395.
- 4 E. Gil-Av et D. Nurok, *Adv. Chromatogr.*, 10 (1974) 99.
- 5 A. E. Pierce, *Silylation of Organic Compounds*, Pierce, Rockford, IL, 1968, p. 259.
- 6 J. Lehrfeld, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 141.
- 7 F. Nachtmann et K. W. Budna, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 279.
- 8 N. A. Parris, *Instrumental Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1976.