

CHROM. 14,374

Note

Séparation et dosage du L-fucose et du D-xylose par chromatographie liquide à haute pression

Application à l'analyse des polysaccharides sulfurylés des algues brunes

B. KLOAREG

Centre d'Études Océanographiques et de Biologie Marine, C.N.R.S., L.P.4601, 29211 Roscoff (France)
et Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, Université de Bretagne Occidentale, 29200 Brest (France)*

(Reçu le 4 mai 1981; manuscript modifié reçu le 14 septembre 1981)

L'application de la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) à l'analyse des polysaccharides sulfurylés des algues brunes nécessite que l'on puisse identifier et doser par cette technique le fucose, le xylose, le mannose, le galactose, et l'acide D-glucuronique constituants de ces macromolécules¹, ainsi que ceux apportés par d'éventuels contaminants tels que la laminarine (β 1-3 glucane) ou l'algine (copolymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique).

Les techniques de HPLC utilisées pour le dosage des glucides peuvent être réparties en deux groupes, selon qu'elles font appel ou non à une transformation chimique préalable des oses à doser. Parmi les méthodes ne nécessitant aucune transformation des oses avant chromatographie, on peut citer: la chromatographie d'absorption sur silice²⁻⁴, sur phase inverse de silice aminée^{5,6} ou amino-alkylée^{7,8}, ou greffée C₁₈⁹; la chromatographie d'échange d'ions¹⁰⁻¹³; la chromatographie d'exclusion¹⁴, ou encore des méthodes mixtes qui allient plusieurs de ces types de chromatographie¹⁴⁻¹⁶. Toutes ces méthodes conviennent au dosage des hexoses et des oligosaccharides, mais aucune d'entre elles ne permet une bonne résolution des mélanges de pentoses et méthylpentoses, si l'on excepte la technique récemment mise au point par Heyraud et Rinaudo⁹ qui permet, sur phase inverse de silice C₁₈ de séparer le fucose du xylose. De plus, leurs applications sont limitées par la faible sensibilité à l'égard des glucides des détecteurs actuellement disponibles.

C'est pour pallier à cet inconvénient qu'ont été développées des techniques comportant une transformation des glucides, avant leur injection ou en sortie de colonne. Les dérivations post-colonne¹⁴ s'accompagnent souvent d'une diminution de résolution des pics chromatographiques² et ne peuvent donc pas être utilisées pour doser des oses qui sont mal séparés en sortie de colonne. A l'inverse, les techniques qui font appel à une dérivation pré-colonne des oses par des chromophores aromatiques¹⁷⁻²¹ n'abaissent pas la qualité de leur résolution, tout en multipliant par trois ou quatre ordres de grandeur la sensibilité de leur détection. Bien plus, la fixation des chromophores accroît, en modifiant les fonctions et la structure spatiale des oses, les possibilités de séparation chromatographique d'oses très voisins dans l'état non dé-

rivé. Toutefois, aucune des méthodes de dérivation existantes ne permettait, avec les conditions de phase stationnaire et de phase mobile décrites par leurs auteurs, de doser le fucose et le xylose en mélange.

Nous nous sommes donc attaché à résoudre ce problème particulier, en prenant comme base de départ la méthode proposée par Thompson²⁰ pour la séparation des dérivés benzyloxime-perbenzoyle des oses simples, non carboxyliques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide LDC (Sopares, Gentilly, France) comprenant une pompe Constametric II G, une vanne d'injection à boucle (100 μ l) Valco, une colonne Sphérisorb NH_2 5 μ m (200 \times 4.7 mm I.D.), ou une colonne Spherosil XOA 800-7 μ m (150 \times 4.7 mm I.D.) un détecteur UV Spectromonitor III, et un enregistreur Linear.

Les glucides standards utilisés ont été fournis par Sigma (St Louis, MO, U.S.A.) et les produits nécessaires à la dérivation, benzyloxime et chlorure de ben-

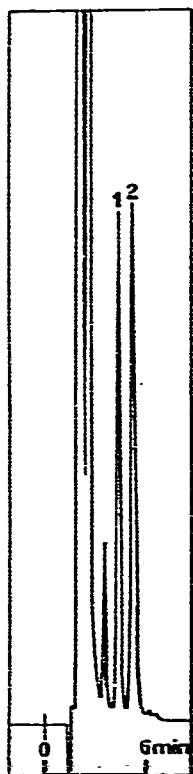


Fig. 1. Séparation par HPLC du fucose et du xylose à l'aide d'un mélange d'hexane et de dichlorométhane (éluant D). Phase mobile, hexane-dichlorométhane (68:32); phase stationnaire, silice aminée; débit, 2 ml/min; détecteur, spectrophotomètre UV, 230 nm. 1 = Benzyloxime-tetrabenzoylé-L-fucose; 2 = benzyloxime-tetrabenzoylé-D-xylose.

zoyle par Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.). Tous les solvants utilisés (qualité Uvasol ou LiChrosolv) provenaient de chez Merck (Paris, France). Chaque éluant était dégazé avant utilisation à l'aide d'une sonde à ultra-sons (Sourimase 250 T, 220 V) et filtré sur filtre Millipore 0,45 μm .

Les glucides (2–100 μg) ont été dérivés selon la méthode décrite par Thompson²⁰, et extraits du mélange réactionnel selon le protocole suivant, adapté de la technique utilisée par Lehrfeld¹⁷. L'excès de réactif est hydrolysé par 500 μl de méthanol. La solution obtenue est évaporée sous un courant d'air comprimé. Les glucides dérivés sont alors repris par 5 ml d'hexane. Après centrifugation (2000 g, 2 min), un aliquote (1 ml) du surnageant est évaporé à sec. Le résidu est lavé par 3 ml d'eau saturée en bicarbonate de sodium et repris par 2 ml d'hexane. Un aliquote (10 à 100 μl) de la phase organique est alors soumis à chromatographie.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Choix d'un éluant permettant la séparation du fucose et du xylose

L'éluant utilisé par Thompson (hexane–dioxanne, 80:20) ne permet qu'une résolution médiocre du fucose et du xylose, que ce soit avec une colonne de silice ou avec une colonne de silice aminée.

L'utilisation d'un mélange binaire (éluant I) de dichlorométhane et d'hexane dans le rapport 32:68 conduit à une séparation complète du fucose et du xylose (Fig. 1), mais ne permet pas d'obtenir une séparation satisfaisante des hexoses (Tableau I).

En définitive, nous avons opté pour un solvant ternaire, composé d'hexane, de dichlorométhane et de dioxanne (éluant II) dans les proportions 50:7.5:2.5. Cet éluant

TABLEAU I

TEMPS DE RÉTENTION DE QUELQUES MONOSACCHARIDES POUR UNE PHASE STATIONNAIRE DE SILICE AMINÉE ET UNE PHASE MOBILE

Phase mobile: éluant I, hexane–dichlorométhane (68:32); éluant II, hexane–dichlorométhane–dioxanne (50:7.5:2.5).

| | <i>Temps de rétention (min)</i> | |
|----------------|---------------------------------|------------------|
| | <i>Éluant I</i> | <i>Éluant II</i> |
| Glycérol | 4.10 | 4.00 |
| Mésoérythritol | 5.30 | 5.40 |
| L-Rhamnose | 4.40 | 5.70 |
| L-Fucose | 4.40 | 5.70 |
| D-Xylose | 5.40 | 6.50 |
| L-Arabinose | 4.90 | 6.40 |
| Xylitol | 6.10 | 8.50 |
| D-Fructose | 5.65 | 9.00 |
| D-Glucose | 5.90 | 9.60 |
| D-Galactose | 6.45 | 10.40 |
| D-Mannose | 6.30 | 10.00 et 10.60* |
| Mannitol | 7.65 | 12.20 |

* Deux pics, représentant respectivement 18.5% et 81.5% de la quantité injectée.

permet une bonne séparation du fucose et du xylose avec 98 % environ de retour à la ligne de base, tout en conduisant à une résolution satisfaisante des hexoses (Tableau I et Fig. 2). Toutefois, il n'est pas possible à l'aide de ce solvant de séparer le mannose du galactose.

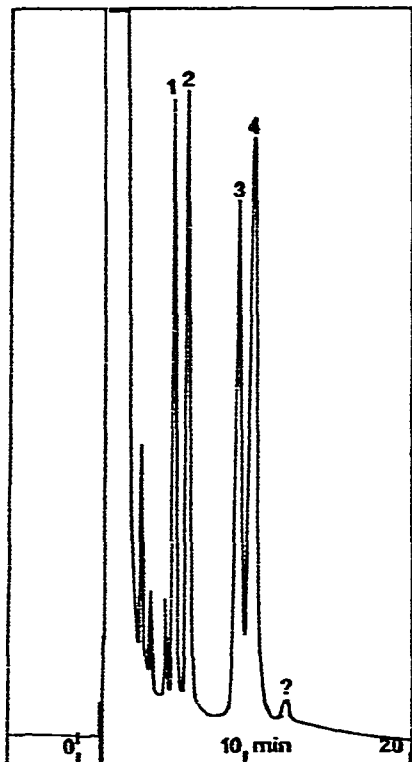


Fig. 2. Séparation par HPLC du fucose, du xylose, du glucose et du galactose à l'aide d'un mélange d'hexane, de dichlorométhane et de dioxane (éluant II). 1 = Benzyloxime-tetrabenzoyle-L-fucose; 2 = benzyloxime-tetrabenzoyle-D-xylose; 3 = benzyloxime-pentabenzoyle-D-glucose; 4 = benzyloxime-pentabenzoyle-D-galactose. Phase mobile, hexane/dichlorométhane/dioxane (50:7.5:2.5). Autres conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 1.

Application à l'analyse de la composition osidique des Polysaccharides sulfurylés des algues brunes

La méthode décrite par Thompson pour l'extraction des glucides dérivés à partir du mélange réactionnel ne nous a pas permis d'obtenir des résultats suffisamment reproductibles pour envisager le dosage de ces dérivés par chromatographie liquide.

Nous proposons donc d'utiliser le précédent protocole d'extraction décrit au chapitre précédent, qui permet de doser les oses présents dans l'échantillon ainsi que l'indique la Fig. 3. L'utilisation d'un standard interne conduit à une précision de dosage de l'ordre de 1 % (Fig. 3b). La limite de détection du L-fucose —cinq fois le

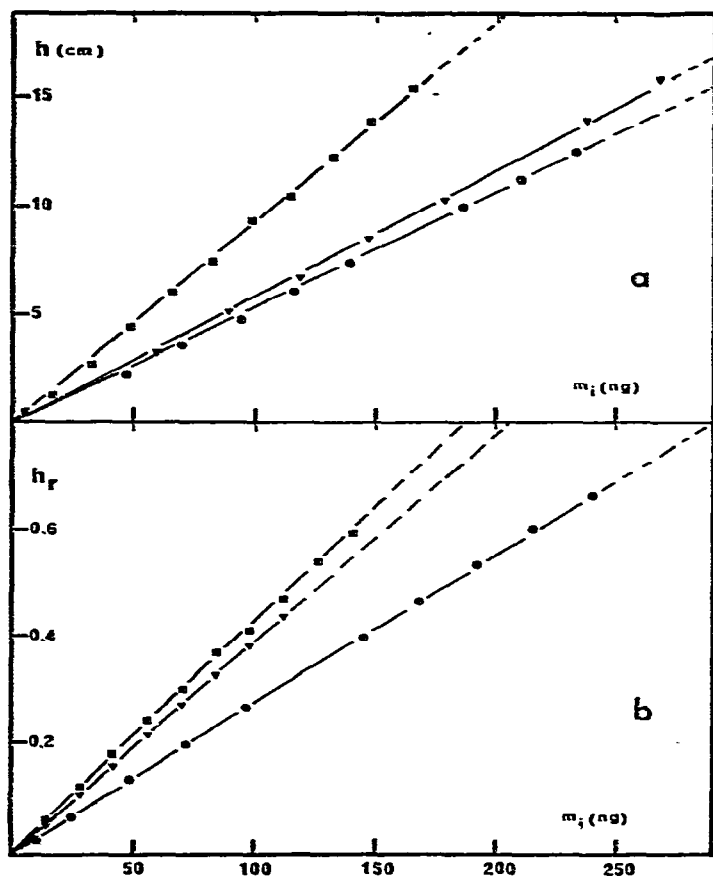


Fig. 3. Courbes d'étalonnage de quelques oses par HPLC. (a) Étalonnage direct; h , hauteur du pic en cm; m_i , masse injectée en ng. ■, Mésoérythritol; ▲, L-arabinose; ●, L-fucose. (b) Étalonnage par référence à un standard interne; h_r , hauteur relative du pic; m_i , masse injectée en ng. ■, Étalonnage du galactose par le xylitol; ▲, étalonnage du fucose par le mésoérythritol; ●, étalonnage du xylose par le mésoérythritol. Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 1.

bruit de fond à 0.005 unité d'absorbance pleine échelle— est environ 1.5 ng avec l'appareillage utilisé. La Fig. 4 représente des exemples de chromatogrammes HPLC obtenus à partir d'hydrolysats de fucoidanes extraits de thalles de *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus* et *Laminaria digitata* (respectivement: P_{cpc} , F_{cpc} et L_{cpc}).

Ces chromatogrammes sont conformes aux résultats précédemment établis par chromatographie d'échange d'ions¹ indiquant que le fucose représente, en masse, environ 90% des oses constituant les fucoidanes purifiés à l'aide de chlorure de cétilypyridinium (cpc).

La méthode de dosage des oses neutres décrite dans cet article apparaît donc comme applicable à l'analyse des polysaccharides sulfurylés des algues brunes.

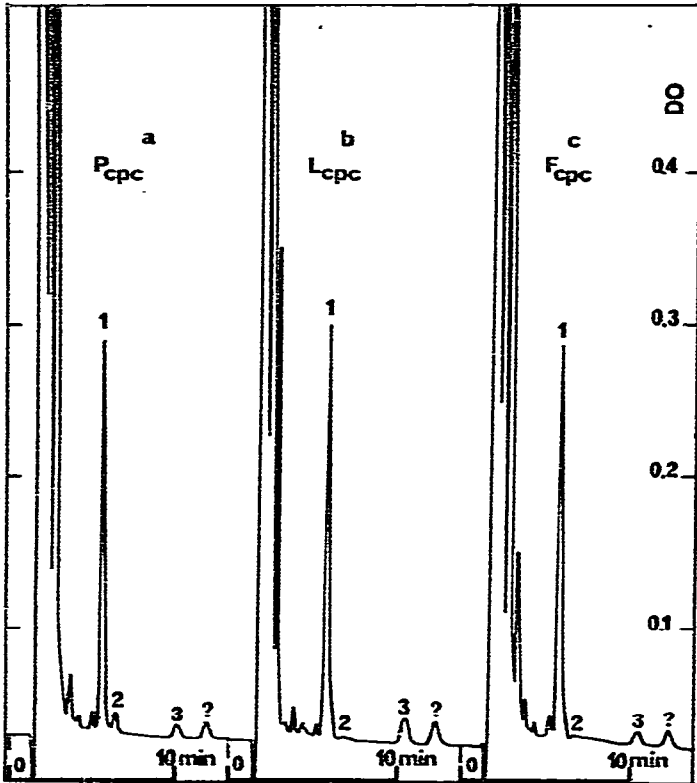


Fig. 4. Exemples de chromatogrammes HPLC obtenus après hydrolyse de fucoidanes extraits de, *Pelvetia canaliculata* (a); *Fucus vesiculosus* (b); *Laminaria digitata* (c). Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 1.

REMERCIEMENT

Ce travail a pu être réalisé grâce à une aide financière exceptionnelle du CNRS pour l'achat d'un appareillage HPLC.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. Kloareg, M. Demarty et M. Quillet, *Physiol. Vég.*, 17 (1979) 731.
- 2 J. L. Kocca et A. Rouhouse, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 216.
- 3 K. Aitzetmüller, *J. Chromatogr.*, 156 (1978) 354.
- 4 B. B. Wheals et P. C. White, *J. Chromatogr.*, 176 (1979) 421.
- 5 J. C. Linden et C. L. Lawhead, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 125.
- 6 R. B. Meagher S.J. et A. Furst, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 211.
- 7 R. Schwarzenbach, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 206.
- 8 V. Kahle et K. Tesařik, *J. Chromatogr.*, 191 (1980) 121.
- 9 A. Heyraud et M. Rinaudo, *J. Liquid Chromatogr.*, 3 (1980) 721.
- 10 V. Gordy, J. C. Baust et D. L. Hendrix, *Bryologist*, 81 (1978) 532.
- 11 L. E. Fitt, W. Hassler et D. E. Just, *J. Chromatogr.*, 187 (1980) 381.
- 12 R. Oshima, Y. Kurosu et J. Kumanotani, *J. Chromatogr.*, 179 (1979) 376.

- 13 R. Oshima, N. Takai et J. Kumanotani, *J. Chromatogr.*, 192 (1980) 452.
- 14 D. Noel, T. Hanai et M. d'Amboise, *J. Liquid Chromatogr.*, 2 (1979) 132.
- 15 J. Wong-Chong et F. A. Martin, *Agr. Food Chem.*, 27 (1979) 929.
- 16 R. Schwarzenbach, *J. Liquid Chromatogr.*, 2 (1979) 205.
- 17 J. Lehrfeld, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 141.
- 18 F. Nachtmann et K. W. Bunda, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 1576.
- 19 R. Schwarzenbach, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 304.
- 20 R. M. Thompson, *J. Chromatogr.*, 166 (1978) 201.
- 21 C. A. White, J. F. Kennedy et B. T. Golding, *Carbohydr. Res.*, 76 (1979) 1.
- 22 E. Percival et R. M. McDowell, *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press, Londres, 1967.