

CHROM. 7567

## Note

### Séparations en chromatographie sur couches minces des dérivés chlorophylliens tétrapyrroliques et application à la recherche de ces dérivés dans un fruit en cours de maturation\*

MICHELLE DURAND et DANIELLE LAVAL-MARTIN

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Université de Paris, Paris VI (France) et Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux (CNRS), 4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon (France)

(Reçu le 15 janvier 1974; manuscrit modifié reçu le 20 mai 1974)

La chromatographie ascendante sur couches minces est fréquemment employée pour la séparation de faibles quantités de pigments liposolubles<sup>1</sup>. Si certains auteurs<sup>2</sup> distinguent jusqu'à 18 pigments dans des extraits d'algues ou de fruits en cours de maturation, d'autres<sup>3-4</sup> pensent que beaucoup de ces taches sont des produits de transformation des chlorophylles ou des caroténoïdes apparus *in vitro* au contact des adsorbants inorganiques.

Nous nous proposons de caractériser d'éventuels dérivés chlorophylliens de nature tétrapyrrolique pouvant apparaître *in vivo* au cours de la maturation du fruit de *Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme* (tomate "cerise"). Pour cela nous avons défini des conditions assurant la non dégradation *in vitro* des pigments étudiés, puis avons appliqué, à un extrait volontairement enrichi en dérivés tétrapyrroliques artificiels, divers types de chromatographie sur couche mince. Nous avons alors sélectionné celui qui donnait la meilleure séparation d'un nombre maximum de taches, donc qui pouvait nous permettre de détecter les produits cherchés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal et extraction des pigments

La mise au point des systèmes chromatographiques a été faite à l'aide d'extraits pigmentaires de feuilles fraîches de *Symphytum officinale*, réalisés sous conditions ambiantes de température, lumière et atmosphère, de façon à obtenir un maximum de dérivés tétrapyrroliques. Après broyage au broyeur à billes (type Dangoumau) les pigments sont extraits par de l'acétone aqueuse (concentration finale 80:20) puis transférés dans de l'éther de pétrole (30-50°). L'extrait ainsi obtenu est évaporé à sec et les pigments repris dans l'acétone. Lors de l'étude physiologique portant sur des fruits lyophilisés de tomate "cerise", pour éviter les dégradations *in vitro* des pigments, le broyage a été fait en présence de borate d'ammonium et d'azote liquide. L'extraction à une température voisine de 4° et à l'abri de la lumière.

\* La conception de ces méthodes revient à Noël Delaporte, décédé.

### *Méthodes chromatographiques*

Les essais, réalisés en chromatographie monodimensionnelle à l'aide de différents systèmes de solvants, ont porté systématiquement sur la qualité des revêtements (leur nature organique ou inorganique, leur épaisseur, leur polarité et l'importance du liquide de dispersion). Les revêtements servent soit de support à une phase stationnaire solide ou liquide, soit de phase stationnaire. Dans le premier cas, si la phase stationnaire est apolaire, il s'agit d'un système à *phases inversées*, par rapport aux systèmes courants pour lesquels la phase stationnaire est polaire, la phase mobile apolaire. La nature du revêtement a, dans ce dernier cas, beaucoup d'importance: ainsi les adsorbants inorganiques, type gel de silice, peuvent entraîner des transformations de pigments<sup>3-1</sup>. Certains de nos essais ont cependant porté sur de tels revêtements souvent utilisés<sup>5-6</sup>, afin de comparer les résultats avec ceux obtenus sur des revêtements de nature organique préférés par quelques auteurs<sup>7-8</sup>. Nous avons combiné en systèmes bidimensionnels les solvants de développement les plus satisfaisants.

### *Techniques*

Les revêtements sont déposés, sur des plaques de verre (20 × 20 cm), à l'aide d'un étaleur manuel (Shandon Unoplan), après homogénéisation au mixer (Omnimixer, Serval) dans un liquide que nous nommons liquide de dispersion. L'épaisseur du revêtement est généralement de 0.4 mm, sauf indication dans le texte. Les cuves sont hermétiques, certaines équipées pour admettre un courant d'azote et un enrichissement progressif en un solvant déterminé. D'autres cuves sont à front perdu. Il faut en moyenne 16 h pour saturer les cuves dans le cas de systèmes à phase stationnaire polaire, 1 h si les phases sont inversées ou s'il s'agit d'une chromatographie pour laquelle les forces d'adsorption sont dominantes. Dans tous les cas les développements se déroulent à l'obscurité à température ambiante et leur durée n'excède jamais 1 h 30 min. Le repérage des taches se fait à la lumière du jour et en lumière ultra-violette.

### *Produits utilisés*

**Revêtements organiques.** Les revêtements organiques utilisés sont: Poudres de cellulose ordinaires, de grain 15–40  $\mu\text{m}$  (CC31 Whatman) ou 10–25  $\mu\text{m}$  (CC41 Whatman); cellulose imprégnée de polyéthylène-imine (PEI Merck). Poudre de saccharose du commerce, renfermant 3% de matières amylacées, tamisée au laboratoire pour obtenir des grains de 60–80  $\mu\text{m}$ .

**Revêtements inorganiques.** Les revêtements inorganiques utilisés sont: Poudre de borate d'ammonium (Merck) tamisée (grains 60–80  $\mu\text{m}$ ). Poudre d'alumine (Merck). L'ascorbate de sodium (Merck) est employé comme adjuvant des différents revêtements.

**Liquides de dispersion.** Les liquides de dispersion sont indiqués dans le Tableau I pour chaque type de couche mince ainsi que les rapports volume/poids de poudre (ml/g).

**Solvants de développement.** Pyridine, acétonitrile, pentane, hexane, heptane et octane sont des produits Carlo Erba R.P.; les alcanes supérieurs des produits Schuchardt.

TABLEAU I  
LIQUIDES DE DISPERSION EMPLOYÉS POUR LE DÉPÔT DES COUCHES MINCES ET RAPPORTS VOLUME DE LIQUIDE (ml)/POIDS DE POUDRE (g)

CC3/	CC4/	Saccharose		Borate d'ammonium		Alumine
Méthanol (Merek)	Méthanol (Merek)	Acétone (Merek)	Chloroforme (Merek)	Chloroforme-hexane (50:50)	Azétrope chloroforme-méthanol (78:22)	Chloroforme (Merek)

Rapports  
(volume de liquide)/  
(poids de la poudre)  
ml/g

2.1 1.8 1.5 1.5 1.6 1.7 1.1 2.3

## RÉSULTATS

*Étude des qualités des revêtements et des solvants de développement pour les essais monodimensionnels*

**Systèmes à phase stationnaire polaire.** L'acétonitrile, la pyridine et leurs azéotropes avec l'eau ont permis des séparations nettes seulement si les cuves sont à front perdu. Sur certains revêtements (saccharose, cellulose, borate d'ammonium, alumine) la pyridine et son azéotrope avec l'eau donnent des résultats médiocres si la phase mobile est du pentane ou de l'éther de pétrole (30–50°), et des résultats satisfaisants si la phase mobile utilisée est un alcane (de C<sub>6</sub> à C<sub>8</sub>). Ainsi nous avons séparé neuf taches bien distinctes à l'aide des systèmes suivants: CC41/pyridine/hexane; saccharose/azéotrope pyridine-eau/hexane; borate d'ammonium/azéotrope pyridine-eau/heptane, et même dix taches sur saccharose si nous substituons l'octane à l'hexane\*.

**Systèmes à phases inversées.** Ces essais ont été réalisés dans des cuves hermétiques avec les phases stationnaires suivantes: huile de vaseline, pentadécane, hexadécane, octadécane, la phase mobile pouvant être l'acétonitrile, la pyridine, leurs azéotropes avec l'eau, l'azéotrope hexane-propanol, des mélanges pentane-propanol ou des mélanges acétone-méthanol-eau. Le système saccharose/hexadécane (à 10% dans l'hexane)/méthanol-eau (93:7) et les systèmes borate d'ammonium/hexadécane (à 10% dans l'éther de pétrole, 30–50°)/acétone-méthanol-eau (40:40:8 ou 20:80:10) permettent de séparer dix taches dont la répartition et la netteté sont excellentes.

Au cours de ces essais, nous avons par ailleurs montré que la présence dans la phase mobile d'un alcane permettant la conservation à 4° des taches de pigments sur les plaques, ne gêne ni la migration de cette phase, ni la séparation des pigments.

**Revêtements constituant eux-mêmes une phase stationnaire.** La cellulose CC41, le saccharose et le borate d'ammonium ont maintenant servi de phases stationnaires dans des systèmes chromatographiques à éluions successives. Les résultats obtenus, portés dans le Tableau II, montrent que, sur saccharose, ces éluions séparent très nettement un grand nombre de pigments.

Nous avons tenu à vérifier que certaines de ces taches ne correspondaient pas à des dérivés apparus, par oxydation des pigments, lors des nombreux séchages à l'air séparant les opérations d'élutions successives, ou bien à des dérivés dûs à une attaque acide au cours des éluions elles-mêmes. Pour cela nous avons adjoint aux revêtements de l'ascorbate de sodium comme antioxydant et du borate d'ammonium qui évite toute attaque acide des chlorophylles ou de leurs dérivés. Sur saccharose la migration et la séparation des pigments a été trouvée inchangée, à condition de ne pas dépasser des teneurs de 0.4% en ascorbate de sodium, de 4% en borate d'ammonium et d'éluer avec de l'hexane enrichi à chaque fois de 0.3% en propanol au lieu de 0.4%.

*Essais de chromatographie bidimensionnelle*

Sur CC41, les résultats sont améliorés si le développement est effectué avec le système azéotrope pyridine-eau/hexane en première dimension et le système à quatre éluions successives, hexane enrichi à chaque opération de 0.6% de propanol (cf.

\* Au cours de cette étude nous avons montré l'importance capitale du liquide de dispersion. Ainsi, lorsque le saccharose est déposé à l'aide du méthanol il n'y a aucune séparation avec le système pyridine-eau/hexane. Pour avoir de bonnes séparations des pigments le saccharose doit être déposé à l'aide d'acétone, de chloroforme ou d'un mélange chloroforme-hexane (50:50).

TABLEAU II

NOMBRE DE PIGMENTS SÉPARÉS À PARTIR D'UN EXTRAIT DE FEUILLES DE SYMPHYTUM PAR ÉLUTIONS SUCCESSIVES SUR DES REVÊTEMENTS CONSTITUANT EUX MÊMES LA PHASE STATIONNAIRE

L'azéotrope chloroforme-méthanol (78:22) est utilisé pour déposer la cellulose CC41 et le borate d'ammonium; le chloroforme pur pour déposer le saccharose. Dans tous les cas, pour une chromatographie effectuée sur une hauteur  $h$  par  $n$  éluants successifs: le premier éluant parcourt  $h/n$  en 5 à 10 min, le second  $2h/n$  en 15 à 20 min et le  $n$ ième  $h$ . La durée totale des développements n'excède pas 1 h 30 min, le séchage de la plaque entre deux éluations ne nécessite que quelques minutes.

<i>Nature des revêtements</i>	<i>Éluants successifs</i>	<i>Séparation des pigments</i> <i>Remarques</i>
CC41 (0.3 mm d'épaisseur)	(1) Hexane ÷ 0.6% de propanol (2) Hexane ÷ 1.2% de propanol (3) Hexane ÷ 1.8% de propanol (4) Hexane ÷ 2.4% de propanol	10 à 12 taches assez bien séparées
Saccharose	(1) Hexane (2) Hexane ÷ 0.4% de propanol (3) Hexane ÷ 0.8% de propanol (4) Hexane ÷ 1.2% de propanol (5) Hexane ÷ 1.6% de propanol	14 à 16 taches bien séparées
Borate d'ammonium	(1) Hexane (2) Hexane ÷ 0.19% de propanol (3) Hexane ÷ 0.38% de propanol (4) Hexane ÷ 0.57% de propanol	7 à 10 taches maximum

Tableau II), en deuxième dimension. En lumière naturelle, treize taches vertes et trois taches jaunes, toutes bien séparées, sont dénombrées; en lumière ultra-violette nous distinguons deux nouvelles taches. Soit au total dix-huit taches.

Sur saccharose et borate d'ammonium les résultats sont encore plus satisfaisants. Vingt taches, dont cinq visibles en lumière ultra-violette seulement, sont séparées sur borate d'ammonium dans le système azéotrope pyridine-eau/heptane en première dimension et le système hexadécane à 7.5% dans l'hexane/acétone-méthanol-eau (20:80:10) en deuxième dimension. Quant au saccharose il peut permettre la séparation de vingt-quatre taches avec les deux systèmes suivants: azéotrope pyridine-eau/octane et hexane enrichi en propanol (système à éluations successives, cf. Tableau II). Le schéma de cette séparation est donné dans la Fig. 1.

*Application à la recherche de dérivés chlorophylliens dans des extraits de fruits de tomate "cerise" en cours de maturation*

Trois lots de fruits sont étudiés. Le premier est constitué de fruits verts adultes, c'est-à-dire cueillis au stade<sup>9</sup> marquant la fin de la croissance et le début de la maturation et où la teneur en pigments chlorophylliens est maximale<sup>10</sup>. Le deuxième est constitué de fruits cueillis rose-oranges ou rouges. Le troisième de fruits verts adultes laissés à lumière et température ambiantes jusqu'à ce qu'ils virent au rose ou rouge orangé.

L'application, aux trois lots de fruits, des meilleurs systèmes chromatographiques définis précédemment et en particulier du système saccharose/azéotrope pyridine-eau/octane en première dimension, hexane enrichi progressivement en propanol

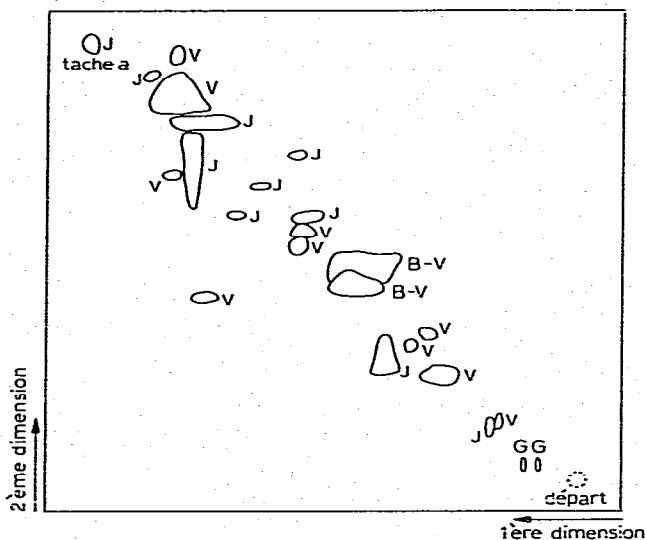


Fig. 1. Schéma du développement bidimensionnel, sur couche mince de saccharose, d'un extrait de feuilles de *Symphytum*. Le saccharose contient 4% de borate d'ammonium et 0.3% d'ascorbate de sodium. Première dimension: azéotrope pyridine-eau/octane; deuxième dimension: quatre éluions successives dans hexane puis hexane enrichi trois fois de propanol (0.3% à chaque fois). Abréviations: B-V = bleu-vert; G = gris; J = jaune; V = vert. Au niveau de la tache *a* se retrouvent les carotènes non oxygénés les plus apolaires ( $\beta$ -carotène dans le cas d'un extrait de feuille ou de fruit de tomate verte; mélange phytofluène, lycopène et  $\beta$ -carotène dans le cas de fruits rouges).

en deuxième dimension, n'ont alors permis de séparer que deux pigments verts correspondant aux deux chlorophylles *a* et *b* en plus des caroténoïdes déjà définis<sup>10</sup>.

## CONCLUSION

Nous définissons un système de chromatographie sur couches minces de saccharose qui permet une séparation fine des carotènes oxygénés (époxy- et hydroxycarotènes) et des pigments tétrapyrroliques d'origine chlorophyllienne. Sur un extrait pigmentaire obtenu en conditions telles, qu'il y a dégradation *in vitro* des chlorophylles, nous avons à l'aide de ce système pu dénombrer jusqu'à vingt-quatre taches dont une quinzaine correspondait à des composés tétrapyrroliques. Dans le cas des extraits de fruits mûrs préparés en présence d'azote liquide, à l'abri de la lumière et au froid, ce même procédé n'a jamais permis de détecter la présence de dérivés chlorophylliens tétrapyrroliques. Nous pensons donc, en accord avec certains auteurs<sup>11</sup>, qu'au cours de la maturation les produits de dégradation des chlorophylles n'apparaissent pas sous forme de composés de nature tétrapyrrolique.

Des contrôles utilisant une distribution automatique d'éluant en gradient continu de polarité, sous atmosphère d'azote, ou l'adjonction d'antiacides ou d'antioxydants dans le revêtement des plaques, ont montré qu'il ne se produisait pas de dégradation des pigments séparés au cours des développements successifs.

Enfin, la présence d'alcane dans la phase mobile a pu permettre la conservation à 4° des pigments en place après chromatographie.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Z. Šesták, *Photosynthetica*, 1 (1967) 269.
- 2 S. H. Schanderl et D. Y. C. Lynn, *J. Food Sci.*, 31 (1966) 141.
- 3 H. H. Strain, J. Sherma et M. Grandolfo, *Anal. Chem.*, 39 (1965) 926.
- 4 M. F. Bacon, *Biochem. J.*, 101 (1966) 34C.
- 5 D. Baraldi, *Agrochimica*, 15, No. 4-5 (1971) 371.
- 6 A. S. L. Tirimanna et R. L. Wickremasinghe, *Qual. Plant. Mater. Veg.*, 20, No. 4 (1971) 341.
- 7 S. W. Jeffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 271.
- 8 J. Sherma, *Anal. Lett.*, 3, No. 1 (1970) 35.
- 9 D. Laval-Martin, *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, 15, No. 1 (1969) 77.
- 10 D. Laval-Martin, J. Quennemet et R. Moneger, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 274 (1972) 2879.
- 11 C. O. Chichester et T. O. Nakayama, dans T. W. Goodwin (Rédacteur), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, Londres, New-York, 1965, p. 442.