

CHROM. 8135

## Note

### Analyse des solutions de glutaraldéhyde par la chromatographie sur couche mince et sur couche épaisse

J. BLASS, C. VERRIEST et A. LEAU

Laboratoire de Chirurgie Expérimentale, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, 129, rue de Tolbiac, 75 013 Paris (France)

(Reçu le 6 novembre 1974)

Le glutaraldéhyde (G) de qualité technique, utilisé comme un réactif efficace de cross-linking des protéines contient comme l'a montré la spectrophotométrie en UV<sup>1-3</sup>, en plus de G monomérique absorbant à 280 nm, un matériel polymérisé, absorbant à 235 nm; celui-ci serait de nature aldehydique<sup>3,4</sup> (aldols  $\alpha,\beta$ -non-saturés).

Le spectre de résonance magnétique du G commercial correctement interprété<sup>5,6</sup> a conduit à minimiser le rôle de ce matériel, considéré au départ comme responsable de la fixation irréversible du G sur les protéines<sup>4</sup>. Il s'agirait d'une impureté de nature indéterminée, présente en quantités négligeables<sup>6</sup>. Cependant sous l'effet des divers agents physiques et chimiques ( $\text{pH} \geq 7$ , lumière, chaleur) l'absorption à 235 nm augmente considérablement et l'on peut supposer dès lors la formation des formes polymérisées du G.

L'analyse des diverses solutions de glutaraldéhyde par chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie sur couche épaisse (CCE) avait pour but de vérifier la nature aldehydique du matériel polymérisé absorbant à 235 nm et sa proportion par rapport au G monomérique. Elle a été menée dans le cadre d'une étude plus générale du tannage des valves aortiques de porc utilisées pour le traitement de certaines cardiopathies valvulaires<sup>7</sup>.

Seul Anderson<sup>2</sup> avait précédemment comparé, par chromatographie sur papier, les G commercial et monomérique; cependant sa technique manque de spécificité et de sensibilité et ne nous a pas permis une séparation satisfaisante des constituants.

L'intérêt de la technique décrite ici réside dans la révélation *in situ* des aldehydes non volatils séparés par chromatographie, par le test spécifique de Sawicki *et al.*<sup>8</sup>, basé sur la transformation des aldehydes en azines et l'oxydation de ces dernières, les produits oxydés apparaissant comme taches bleues sur un fond légèrement teinté.

Ce procédé est beaucoup plus sensible que celui utilisant pour la révélation des aldehydes (et des cétones) la 2,4-dinitrophénylhydrazine<sup>9</sup>.

D'autre part la séparation des constituants aldehydiques sans leur transformation préalable en 2,4-dinitrophénylhydrazones<sup>10,11</sup> ou en azines<sup>12</sup> présente l'avantage de permettre leur étude spectroscopique, après élution.

## TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

*Matériel*

Une solution de G monomérique à 70 % (Ladd Research Lab., Burlington, Vt., É.U.); trois échantillons de G commercial de qualité technique: G à 25 % (Serlabo, Paris, France); G à 25 % (TAAB Lab., Reading, Angleterre) et G à 50 % (Eastman, Rochester, N.Y., É.U.); quatre aldehydes non volatils: hexylique, heptylique, octylique et décylque (Serlabo).

*Technique chromatographique*

**CCM.** Couche de 0.25 mm de gel de silice préfabriquée (Merck, Darmstadt, Allemagne Fédérale, MD 5728). Les plaques (20 cm × 20 cm) sont activées par chauffage 1 h à 110°, avant l'emploi. On dépose 2 à 4  $\mu$ l d'une solution de G à 0.1 %.

Le solvant utilisé était: benzène-méthanol-éther éthylique (60:5:15).

La chromatographie ascendante avait un trajet de 15 cm et une durée de 40–45 min. La chromatographie ascendante continue, d'après Munier et Sarrazin<sup>13</sup>, avait une durée de 2 h et 30 min. Les plaques sont séchées à l'air. Le révélateur était préparé comme suit: On pulvérise une solution de N-méthyl benzothiazolone hydrazone HCl (MBTH) à 1 % (EGA, Chemie K. G. Keppler et Reif, Steinheim/Albuch, Allemagne Fédérale), 10 min au repos. On évapore la couche de MBTH avec un courant d'air froid (formation des azines). On pulvérise une solution de chlorure ferrique à 2 %, à deux ou trois reprises (pour révéler les taches faibles), en épongeant l'excès de réactif entre chaque pulvérisation. Limite de sensibilité 0.015  $\mu$ g (G monomérique).

**CCE.** Une couche de 0.8 mm de gel de silice HF, sur plaques de 20 cm × 20 cm était utilisée. On dépose en ligne continue sur 16 cm, 160  $\mu$ l d'une solution à 10 % de G commercial. Le développement était continu ascendant, durée 6 h. Les constituants localisés à l'aide d'une bande témoin révélée (large de 2 cm) sont récupérés par grattage, puis élués par 3 ml d'eau chacun. Leurs spectres d'absorption en UV sont déterminés contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau (Beckman, Modèle 25). La nature des éluats est confirmée par CCM.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Solution de glutaraldehyde commercial*

Les trois échantillons analysés (pH 4.4) présentent une tache principale correspondant au G monomérique et un nombre variable de taches supplémentaires dont les intensités respectives diffèrent d'un échantillon à l'autre (Fig. 1).

Les  $R_F$  de ces taches, établis d'après un chromatogramme ascendant (trajet 15 cm) correspondaient aux valeurs suivantes: tache principale (G monomérique),  $R_F$  0.23; taches supplémentaires,  $R_F$  0.13 et  $R_F$  0.09 (G Serlabo). À titre de comparaison, les solutions aldehyde en C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub> et C<sub>10</sub> présentaient dans les mêmes conditions, les  $R_F$  respectifs suivants: 0.50, 0.53, 0.55 et 0.63.

Ces taches supplémentaires pouvaient encore être décelées dans 0.4  $\mu$ g de G Serlabo, plus particulièrement étudié. La limite de sensibilité de G monomérique étant de 0.015  $\mu$ g, la teneur des deux taches supplémentaires exprimée en termes de ce dernier serait de 7–8 % au moins, donc loin d'être négligeable.

La chromatographie sur couche mince du G Serlabo, après sa transformation

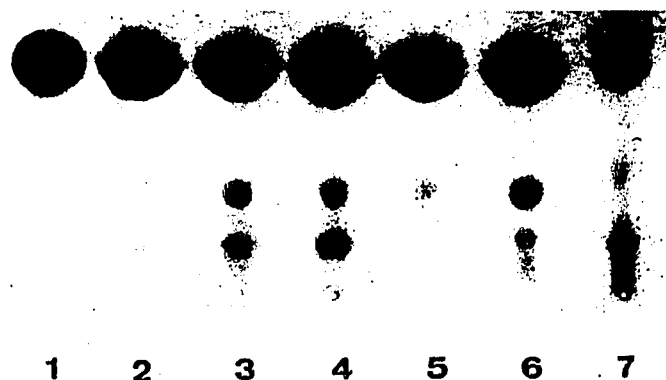


Fig. 1. Chromatogramme sur couche mince des solutions de glutaraldehyde système ascendant continu. 1 = G monomérique (solution 1); 2 = G monomérique après sept jours à pH 7.4, à la température et lumière ambiantes; 3 = G commercial Serlabo (solution 2); 4 = solution 2 chauffée (5 h à 90°, pH 4.4); 5 = G commercial (TAAB Lab.); 6 = G commercial (Eastman-Kodak); 7 = G monomérique chauffée 5 h à 100°, pH 7.4. Quantités déposées: solution 1-6,  $\approx 3 \mu\text{g}$ ; solution 7,  $\approx 10 \mu\text{g}$  avant chauffage.

préalable en dinitrophénylhydrazones (solvant benzène-acétate d'éthyle, 95:5)<sup>14</sup> a confirmé l'existence de deux composés carbonylés supplémentaires, en plus de G monomérique. Le dosage global de la fonction aldehydique ne permet donc pas d'évaluer la teneur en ces "impuretés" et conduit à sous-estimer leur teneur<sup>6</sup>.

La Fig. 2 représente le spectre d'absorption en UV de l'éluat (CCE) renfermant le composé de  $R_F$  0.13, présent dans le G Serlabo.

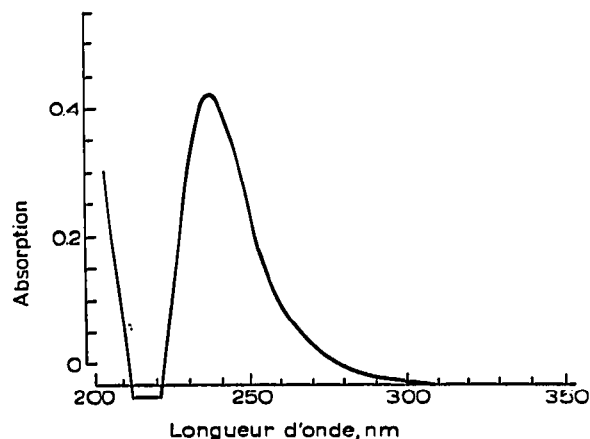


Fig. 2. Spectre d'absorption en UV du composé  $R_F$  0.13, présent dans le G commercial Serlabo, élué à partir d'un chromatogramme préparatif.

On distingue un seul pic à 235 nm (D.O. (densité optique), 0.42). Un résultat analogue a été obtenu pour le composé de  $R_F$  0.09. Le G Serlabo au moment de son utilisation pour CCE présentait les caractéristiques spectrophotoscopiques suivantes: solution à 0.5%, pic à 280 nm avec D.O. 0.43 et pic à 235 nm avec D.O. 0.71.

On peut donc conclure que les composés de nature aldehydique, présents à

coté du glutaraldehyde monomérique, dans le glutaraldehyde Serlabo, contribuent à l'absorption à 235 nm de ce dernier.

Ces composés pourraient correspondre aux aldols  $\alpha,\beta$  non saturés, d'un faible degré de polymérisation (dimères et trimères).

#### *Solutions de glutaraldehyde monomérique modifiées par action des divers facteurs*

La solution fraîche ne présente qu'une tache en CCM ( $R_F$  0.23) (Fig. 1) et un seul pic à 280 nm (solution à 0.5 %, D.O. 0.3). Ainsi cette solution convenait mieux que la solution de G commercial pour observer parallèlement, en spectroscopie UV et en CCM, les modifications éventuelles des solutions soumises aux divers traitements.

*Conservation à la température ambiante, pH 7.4.* Au bout de sept jours, une solution diluée (0.5 %) de G monomérique, pH 7.4, exposée à la lumière et à la température ambiantes, a montré en CCM deux faibles taches supplémentaires ( $R_F$  0.13 et  $R_F$  0.09) (point 2, Fig. 1), alors que le spectre d'absorption en UV présentait un pic très important à 235 nm (solution à 0.5 %, D.O. 4.7). Il semble donc que la majeure partie du produit polymérisé à pH 7.4 n'est pas révélable par la technique utilisée. Il pourrait s'agir des aldols  $\alpha,\beta$  non saturés, d'un degré de polymérisation élevé, pauvres en groupements aldehydiques.

*Chauffage en ampoule scellée à 90–105°, pH 4.4.* Le chauffage de 5 h, soit à 90°, soit à 105°, fait apparaître dans les deux cas un pic à 235 nm (D.O. respectives pour la concentration 0.5 % : 0.45 et 1.07). Cependant en CCM aucune nouvelle tache n'apparaît en dehors de la tache principale. Le produit polymérisé par chauffage à pH 4.4 n'est donc pas décelable par la technique utilisée.

Le résultat a été confirmé pour le G Serlabo, chauffé dans les mêmes conditions (90°) (point 4, Fig. 1). Bien que la valeur de la D.O. à 235 nm pour la concentration de 0.5 % ait augmenté de 0.7 à 4.0 par chauffage, on n'observe pas de différence visuelle entre les points 4 et 3 (G non chauffé).

*Chauffage en ampoule scellée, à 105°, pH 7.4.* Le chauffage de 5 h à 105° d'une solution de G monomérique à 2.5 % à pH 7.4 provoque une modification profonde (point 7, Fig. 1). La solution chauffée est teintée en jaune. Le matériel polymérisé formé présente à 235 nm une densité optique extrêmement élevée (D.O. pour la solution diluée 500 fois, 1.56). Le dosage du G, par la méthode au MBTH, d'après Paz *et al.*<sup>15</sup> légèrement modifiée<sup>7</sup>, indique la destruction de 90 % du G présent avant le chauffage. Plusieurs composés de destruction, révélables par la technique utilisée, peuvent être distingués sur le chromatogramme.

#### CONCLUSION

La technique utilisée permet de mettre en évidence la présence d'une seule tache pour le G monomérique et d'évaluer la teneur des taches supplémentaires de nature aldehydique pour le G commercial, ces dernières correspondant aux composés absorbant à 235 nm.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Contrat No. 73 7 11 76 de la D.G.R.S.T. (section Génie Biologique et Médical) avec le concours de l'INSERM.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. D. Fahimi et P. Drochmans, *J. Microsc.*, 4 (1965) 725.
- 2 P. J. Anderson, *J. Histochem. Cytochem.*, 15 (1967) 652.
- 3 E. A. Robertson et R. L. Schultz, *J. Ultrastruct. Res.*, 30 (1970) 275.
- 4 F. M. Richards et J. R. Knowles, *J. Mol. Biol.*, 37 (1968) 231.
- 5 P. M. Hardy, A. C. Nicholls et H. N. Rydon, *Chem. Commun.*, (1968) 565.
- 6 A. H. Korn, S. H. Fearheller et E. M. Filachione, *J. Mol. Biol.*, 65 (1972) 525.
- 7 J. Blass, C. Verriest, A. Leau, H. Detruit et M. Weiss, *Pathol. Biol.*, 22 (1974) 593.
- 8 E. Sawicki, T. R. Hauser, T. W. Stanley et W. E. Elbert, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 93.
- 9 E. Stahl, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, p. 207.
- 10 A. Mehlitz, K. Gierschner et Th. Minas, *Chem. Z.*, 87 (1963) 573.
- 11 G. A. Byrne, *J. Chromatogr.*, 20 (1965) 528.
- 12 F. C. Hunt, *J. Chromatogr.*, 35 (1968) 111.
- 13 R. Munier et G. J. Sarrazin, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 336.
- 14 J. H. Dhont et C. Le Roy, *Analyst (London)*, 86 (1961) 74.
- 15 M. A. Paz, O. O. Blumenfeld, M. Rojkind, E. Henson, C. Turpin et P. M. Gallop, *Arch. Biochem. Biophys.*, 109 (1965) 548.