

CHROM. 8786

Note

Séparation de sucres sur microparticules de silice par chromatographie en phase liquide à haute performance

J. L. ROCCA et A. ROUCHOUSE

Équipe de Recherche Associée au C.N.R.S. (E.R.A. No. 474, M. Porthault et A. Lamotte), Laboratoire de Chimie Analytique III, Université de Lyon I, 43 bd. du 11 novembre 1918, 69621 Villeurbanne (France)

(Reçu le 25 septembre 1975)

L'utilisation de la chromatographie en phase liquide pour l'analyse des sucres présente des avantages certains sur d'autres techniques telles que l'analyse enzymatique ou l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GLC). En effet la première se révèle extrêmement sélective mais également extrêmement coûteuse en raison du prix élevé des réactifs. Quant à la seconde, elle est également très longue car il est nécessaire de préparer des dérivés volatils convenables^{1,2}. Par contre, la chromatographie en phase liquide par échange d'ions (IEC) est une technique utilisée depuis longtemps pour l'analyse des sucres. Samuelson *et al.*³⁻⁵ ont décrit des méthodes de séparations sur des résines échangeuses d'anions (AEC) ou de cations (CEC), les phases mobiles étant alors des solutions eau-éthanol. Une autre technique s'est développée à la suite des travaux de Khym et Zill⁶, basée sur l'aptitude des sucres à donner avec les ions borates des complexes pouvant s'échanger sur des résines échangeuses d'anions. Cette solution a été reprise par de nombreux auteurs⁷⁻⁹. Ces différentes méthodes d'échange d'ions ont été regroupées dans un article récent de Jandera et Churaček¹⁰. Cependant les analyses restent fort longues bien que certaines améliorations aient été apportées dans ce domaine de l'IEC, tant pour l'AEC¹¹, que pour le CEC^{12,13}.

Quelques travaux ont également été réalisés en chromatographie en phase liquide sur des phases stationnaires différentes: ainsi Belue et McGinnis¹⁴ ont utilisé un gel de polyacrylamide et Linden et Lawhead¹⁵ une phase greffée sur silice, le "microbondapak carbohydrate". Un grand nombre de modes de détection des sucres a été également étudié. Les systèmes les plus utilisés sont les plus compliqués mais certainement les plus sensibles; ils consistent à effectuer, à la sortie de la colonne, des réactions destinées à produire des dérivés absorbant à 400-420 nm. Ce sont en général des réactions à l'anthrone, à l'orcinol ou à la cystéine⁷⁻⁹. Davies *et al.*¹¹ ont mis au point une technique utilisant l'hydrazide de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (détection à 400 nm), alors que Katz et Thacker¹⁶, par une réaction à l'acide sulfurique, ont produit des chromophores absorbant à 300 nm. Ces méthodes nécessitent un appareillage spécial à la sortie de la colonne pour effectuer les réactions chimiques et elles s'accompagnent certainement d'une diminution de la résolution des pics chromatographiques et ainsi d'une réduction des possibilités de séparation de la colonne chromatographique elle-même. L'utilisation d'autres détecteurs est également pos-

sible: détecteur réfractométrique^{14,17}, détecteur à ionisation de flamme¹⁸, ou détecteur à fil Pye^{12,19}.

Il convient également de mentionner, pour la séparation des sucres, l'utilisation de la chromatographie sur couches minces (CCM). Quelques essais ont porté sur l'utilisation du polyamide^{20,21}, mais d'autres, plus nombreux, ont été effectués soit sur des plaques de silice²²⁻²⁵, soit sur des plaques de silice imprégnée au préalable de tétraborate ou tungstate de sodium²⁶, d'acide borique²⁷ ou de phosphate monosodique²⁸.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la mise au point d'une séparation de quatre sucres par chromatographie en phase liquide: le fructose, le lactose, le saccharose et le sorbitol. L'analyse de ces constituants présente un certain intérêt notamment dans l'industrie alimentaire (produits laitiers). Nous avons également un problème de temps d'analyse à résoudre, à savoir séparer ces sucres en une durée inférieure à trente minutes. Nous présenterons donc une solution possible à ce problème particulier, ainsi que quelques résultats obtenus avec d'autres sucres.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide Chromatem 38 (Touzart et Matignon, Paris, France) équipé d'un détecteur réfractométrique soit L.D.C. (Sopares, Gentilly, France), soit Waters R400 (Waters Assoc., Le Bourget, France). Les colonnes chromatographiques sont remplies au laboratoire suivant une technique déjà décrite²⁹; les supports sont des LiChrosorb soit SI 60 (5 μm , silice) soit Alox T (5 μm , alumine) (Merck, Paris, France). Tous les chromatogrammes sont effectués à la température ambiante.

L'injection des solutés (1-5 μl) est faite à travers septum à l'aide d'une seringue Hamilton (Touzart et Matignon).

Les sucres utilisés (Merck) pour étalonnage chromatographique sont mis en solution dans l'eau ou dans la phase mobile lorsque cela est possible. Les solvants sont des produits "Prolabo Normapur" ou "pour Analyses".

RÉSULTATS

Des études préalables par CCM sur silice ont montré que les sucres donnaient lieu à des séparations intéressantes avec une phase mobile composée de formiate ou d'acétate d'éthyle, de méthanol ou éthanol ou isopropanol, d'eau et d'acide acétique. La composition la plus satisfaisante a été acétate d'éthyle-méthanol-eau-acide acétique (60:20:10:10, v/v).

Pour passer à la chromatographie en colonnes, nous avons modifié cette composition de solvants notamment en supprimant l'acide acétique (risques de corrosion du matériel). De plus la séparation semble améliorée par l'utilisation du formiate d'éthyle à la place de l'acétate d'éthyle. Nous présentons dans le Tableau I les résultats obtenus pour un certain nombre de sucres avec différentes compositions de la phase mobile (formiate d'éthyle-méthanol-eau). Il apparaît, lorsqu'on compare les valeurs des facteurs de capacité, k' , obtenus avec chacun des trois solvants I, II et III qu'augmenter la quantité d'eau dans la phase mobile n'entraîne qu'une faible diminu-

TABLEAU I

VALEURS DE k' DE DIFFÉRENTS SUCRES SUR UNE COLONNE DE LICHROSORB SI 60 (5 μm)

Phase mobile, formiate d'éthyle-méthanol-eau. I, 60:20:10; II, 55:25:10; III, 55:20:15.

Sucre	k'		
	Phase mobile I	Phase mobile II	Phase mobile III
Ribose	1.06	0.54	1
Xylose	1.20-1.30*		
Arabinose	1.25		
Fructose	1.50	0.77	1.5
Glucose	1.62		
Galactose	1.70-1.94*		
Sorbose	1.27	0.70	1.4
Mannitol	1.92		
Galactitol	1.92		
Sorbitol	1.88	1	1.68
Saccharose	2.42	1.16	2.17
Maltose	2.60	1.40	2.34
Cellobiose	2.65	1.40	2.34
Trehalose dihydrate	3.15		
Lactose	3.40	1.78	2.84
Raffinose	4.60		

* Solutés donnant lieu à deux pics chromatographiques.

tion des rétentions des différents sucres, et par contre, qu'augmenter la quantité de méthanol dans la phase mobile fait diminuer considérablement ces rétentions.

Il semble ainsi que le mécanisme chromatographique soit un mécanisme de partage des sucres entre la phase mobile et la phase stationnaire (silice recouverte d'eau). Pour chacune des trois compositions de la phase mobile, la quantité d'eau est suffisante pour donner un recouvrement maximum de la silice par des molécules d'eau; par contre l'échange des molécules de sucres entre la phase mobile et la phase stationnaire va être en compétition avec celui des molécules de méthanol. Il semble ainsi que les interactions phase mobile (méthanol)-phase stationnaire soient prépondérantes devant celles phase mobile (méthanol)-solutés, si bien que les rétentions sont modifiées par les variations de composition de la phase mobile, mais que les résolutions entre deux solutés voisins ne varient que légèrement.

Le choix d'un tel type de phase mobile d'une part permet l'injection sur la colonne des solutés en solution dans l'eau, et d'autre part rend simple et rapide certaines séparations de sucres (mono-, di-, triholosides).

Les Figs. 1-4 illustrent des séparations obtenues avec les phases mobiles décrites précédemment.

CONCLUSIONS

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'utilisation de microparticules de silice (5 μm) pour la chromatographie en phase liquide de sucres. Nous pensons que ce support présente de l'intérêt d'une part par son prix beaucoup moins élevé que celui des supports échangeurs d'ions, et d'autre part par la possibilité actuelle d'ob-

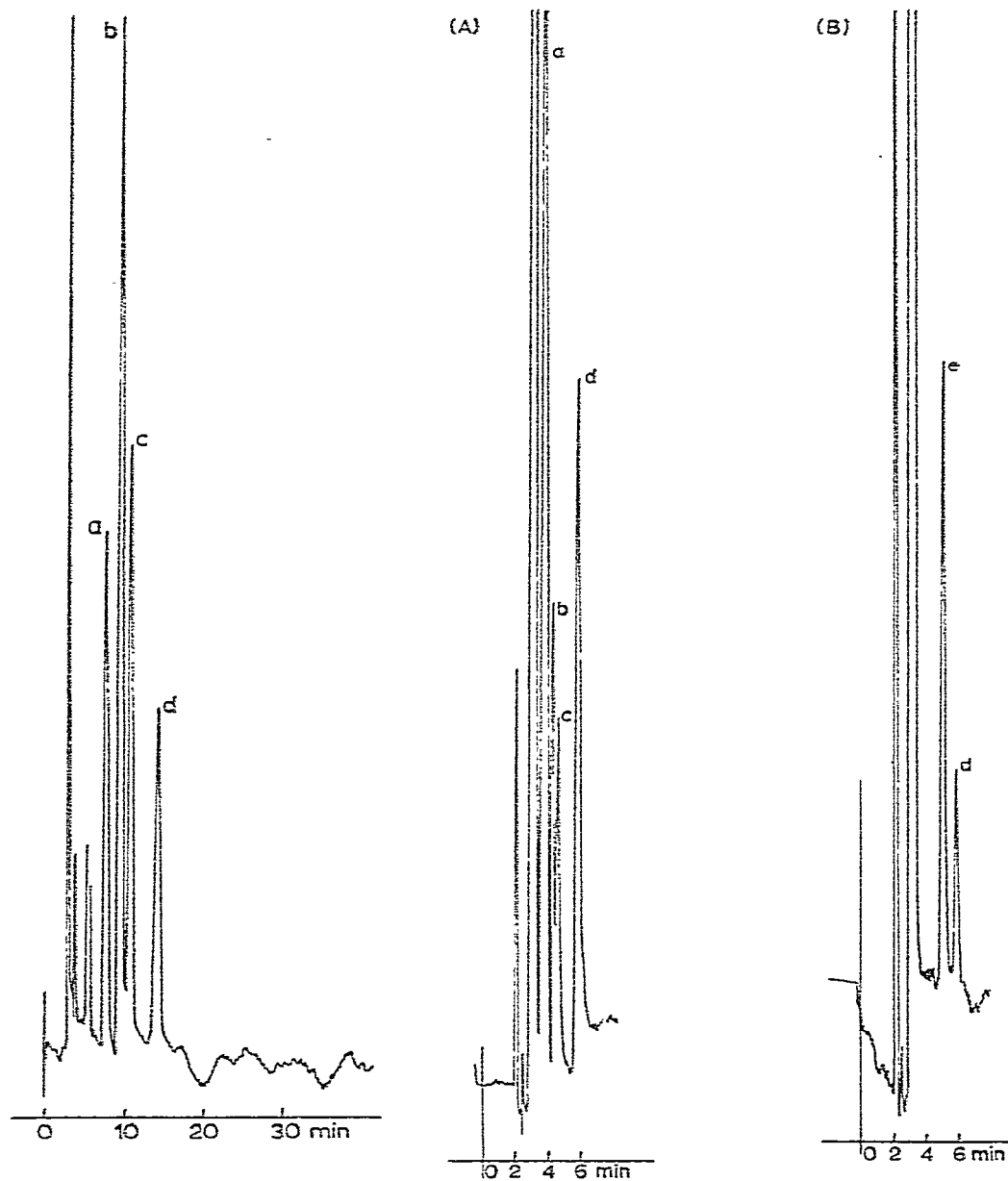


Fig. 1. Séparation de sucres sur LiChrosorb SI 60 ($5\ \mu\text{m}$). Colonne, $15\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ de diamètre interne; vitesse linéaire, u , $0.09\ \text{cm/sec}$; phase mobile, formiate d'éthyle-méthanol-eau (60:20:10); pression, 70 bars; détection, réfractométrie différentielle. a = Fructose, b = sorbitol, c = saccharose, d = lactose.

Fig. 2. Séparation de sucres sur LiChrosorb SI 60 ($5\ \mu\text{m}$). Colonne, $20\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ de diamètre interne; u , $0.15\ \text{cm/sec}$; phase mobile, formiate d'éthyle-méthanol-eau (55:25:10); pression, 85 bars; détection, réfractométrie différentielle. (A): a = fructose, b = sorbitol, c = saccharose, d = lactose; (B): e = maltose et cellobiose, d = lactose.

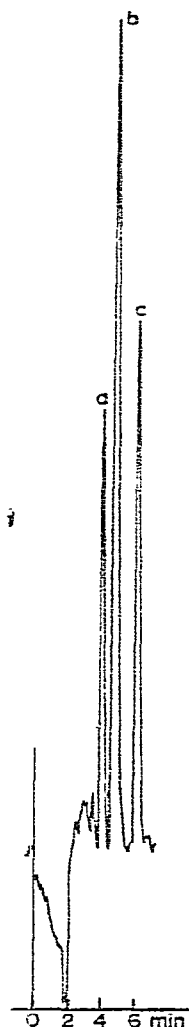


Fig. 3. Séparation de sucres sur LiChrosorb SI 60 ($5 \mu\text{m}$). Colonne, $20 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ de diamètre interne; u , 0.17 cm/sec ; phase mobile, formiate d'éthyle-méthanol-eau (55:20:15); pression, 100 bars; détection, réfractométrie différentielle. a = Ribose, b = sorbose et fructose, c = saccharose.

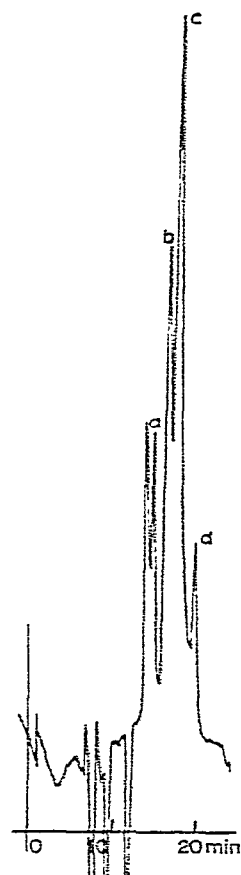


Fig. 4. Séparation de sucres sur LiChrosorb SI 60 ($5 \mu\text{m}$). Colonne, $20 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ de diamètre interne; u , 0.05 cm/sec ; phase mobile, formiate d'éthyle-méthanol-eau (60:20:10); pression, 30 bars; détection, réfractométrie différentielle. a = Xvlose, b = fructose, c = glucose, d = galactose.

tenir, à l'aide de ces supports, des colonnes hautement efficaces. Ceci constitue un préambule à une étude plus complète visant à mettre au point des systèmes offrant une meilleure sélectivité et par là même de meilleures résolutions. Nous sommes conscients également qu'un effort énorme doit être apporté dans la détection des sucres; nous nous sommes limités à la réfractométrie différentielle car nous avons un problème particulier de séparation à résoudre: nous envisageons également d'apporter nos efforts à la mise au point d'autres systèmes de détection pour améliorer les sensibilités d'analyse des sucres.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la société Touzart et Matignon pour le prêt du Chromatem 38, ainsi que la société Waters Assoc. pour le prêt du détecteur à réfractométrie différentielle.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita et W. W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 2 P. K. Davison et R. Young, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 12.
- 3 P. Jonsson et O. Samuelson, *Sci. Tools*, 13 (1966) 17.
- 4 P. Jonsson et O. Samuelson, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 194.
- 5 E. Martinsson et O. Samuelson, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 429.
- 6 J. X. Khym et L. P. Zili, *J. Amer. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2090.
- 7 R. B. Kessler, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1416.
- 8 A. Floridi, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 61.
- 9 L. Hough, J. V. S. Jones et P. Wusteman, *Carbohydr. Res.*, 21 (1972) 9.
- 10 P. Jandera et J. Churáček, *J. Chromatogr.*, 98 (1974) 55.
- 11 A. M. C. Davies, D. S. Robinson et R. Couchman, *J. Chromatogr.*, 101 (1974) 307.
- 12 J. S. Hobbs et J. G. Lawrence, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) 311.
- 13 R. W. Goulding, *J. Chromatogr.*, 103 (1975) 229.
- 14 G. P. Belue et G. D. McGinnis, *J. Chromatogr.*, 97 (1974) 25.
- 15 J. C. Linden et C. L. Lawhead, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 125.
- 16 S. Katz et L. H. Thacker, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 247.
- 17 J. J. Liljamaa et A. A. Hallén, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 153.
- 18 E. P. Foster et A. H. Weiss, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 266.
- 19 J. S. Hobbs et J. G. Lawrence, *J. Sci. Food Agr.*, 23 (1972) 45.
- 20 J. P. Marais, *J. Chromatogr.*, 27 (1967) 321.
- 21 I. Grafe et H. Engelhardt, *Chromatographia*, 5 (1972) 307.
- 22 A. Damonte, A. Lombard, M. L. Tourn et M. C. Cassone, *J. Chromatogr.*, 60 (1971) 203.
- 23 R. Spitschan, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 169.
- 24 K. J. Schäffler et P. G. Morel du Boil, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) 212.
- 25 S. A. Hansen, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 388.
- 26 M. Ghebregzabher, S. Rufini, G. Ciuffini et M. Lato, *J. Chromatogr.*, 95 (1974) 51.
- 27 M. Castino, *Analisis*, 2 (1973) 446.
- 28 S. A. Hansen, *J. Chromatogr.*, 107 (1975) 224.
- 29 B. Coq, C. Gonnet et J.-L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.