

CHROM. 21 419

CONTROLE DE CERTAINS SYSTEMES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE À L'AIDE D'UN DÉTECTEUR ÉVAPORATIF À DIFFUSION DE LUMIÈRE

M. LAFOSSE*, B. HERBRETEAU, M. DREUX et L. MORIN-ALLORY

Laboratoire de Chimie Bioorganique et Analytique, Université d'Orleans, BP 6759, F-45067 Orleans Cedex 2 (France)

(Reçu le 8 février 1989)

SUMMARY

Control of some high-performance liquid chromatographic systems by using an evaporative light scattering detector

The quasi universal character of the light scattering detection of microparticles permits in the case of sugar analysis to choose the column and to control its evolution as a function of time. A simple test is proposed to induce the beginning of the regeneration of resinous Ca^{2+} . LiChrosorb Diol support is preferred to aminopropyl silica to realize at the same time a gradient elution and a good sensitivity (30–50 ng).

INTRODUCTION

Les qualités premières exigées d'une colonne de chromatographie liquide haute performance (CLHP), sont la sélectivité et l'efficacité. Deux autres caractéristiques sont cependant nécessaires: une inertie chimique vis à vis des composés et une durée de vie assez longue.

Lorsque certains solutés réagissent avec la phase stationnaire, l'analyse quantitative est perturbée et la durée de vie de la colonne diminuée. C'est le cas des silices greffées aminopropyles, formant une base de Schiff avec le groupe carbonyle des sucres réducteurs¹. Karlesky *et al.*² a, dans ce cas, proposé une méthode pour régénérer les groupes amino de la phase stationnaire.

Généralement, une évolution lente de la phase stationnaire peut entraîner un changement des temps de rétention³, une modification de la nature du soluté (isomérisation par exemple) ou une adsorption irréversible. Les phases aminopropyles ont été signalées par plusieurs auteurs, comme ayant une durée de vie plus courte que les autres phases greffées^{4–6}: la rétention des solutés diminue, ce qui oblige de modifier l'éluant: une augmentation du taux d'acétonitrile ou une addition d'amine peuvent être réalisées dans le cas d'analyse des sucres. Leur dégradation peut provenir en partie d'une certaine instabilité en milieu aqueux qui d'ailleurs apparaîtrait moins avec les greffages provenant de silanes trifonctionnels qu'avec ceux de silanes monofonctionnels⁶.

Cette transformation de la colonne est rarement brutale, et il n'est pas facile d'en déceler le début.

L'objet de cet article est de montrer qu'un choix non arbitraire de supports utilisés pour l'analyse des sucres ainsi que le maintien des performances des systèmes chromatographiques peuvent être réalisés si l'on utilise une détection particulière: la détection de la lumière diffusée par des microparticules résiduelles après évaporation des phases éluantes.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chromatographie

L'équipement est constitué d'une pompe à gradient Bruker, d'une vanne injecteur Rheodyne, modèle 7125, d'un four Knauer et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière modèles DDL 10 et DDL 11. Le prototype de ce détecteur a été construit au laboratoire, sous Licence ANVAR^{7,8}.

L'effluent est nébulisé sous un courant de gaz inerte et le brouillard ainsi formé pénètre dans un tube évaporateur chauffé où le solvant est évaporé. Les microparticules non volatiles de solutés passent à travers le faisceau lumineux d'une lampe source et la lumière diffusée est recueillie à 120° sur un photomultiplicateur. Le modèle DDL 11 vendu par Cunow (Paris) a une sensibilité (30 ng de glucose) meilleure que celle des autres détecteurs du même type. C'est aussi le seul détecteur évaporatif à diffusion de lumière qui permette d'analyser des composés avec l'eau comme éluant et avec une température d'évaporation aussi basse que 45°C, ce qui évite la dégradation thermique des solutés⁸.

Colonnes

Les colonnes employées sont les suivantes: Sugar Pak 300 × 6,5 mm, Waters CN 150 × 4,6 mm, Waters Carbohydrate 250 × 4,6 mm (Waters), Zorbax NH₂, Zorbax TMS, Zorbax ODS 250 × 4,6 mm, Zorbax OH 250 × 6 mm (DuPont), LiChrosorb Diol 250 × 7 mm, Lichrospher Diol 250 × 10 mm, LiChrosorb NH₂ 150 × 4,6 mm (Merck), R Sil NH₂ Carbohydrate I 250 × 4,6 mm (Alltech), Nucleosil OH 250 × 4,6 mm, Nucleosil NH₂ 250 × 4,6 mm (Macherey Nagel), Polypore H 30 × 4,6 mm, Polypore Ca 220 × 4,6 mm (Brownlee Labs.).

Phase mobile

L'eau distillée (Coopération Pharmaceutique Française) et l'acétonitrile RPE ACS (Carlo Erba) étaient utilisés comme phase mobile. Il faut signaler qu'un bruit de fond assez important était observé avec certaines qualités d'acétonitrile. Notons que ce bruit n'est pas en relation directe avec le taux de résidu sec et nous ne pouvons pas, à l'heure actuelle, expliquer ce phénomène. Nous conseillons donc, pour vérifier la qualité du solvant, de brancher directement le détecteur sans colonne: la ligne de base doit être identique à celle observée lorsque la pompe est arrêtée.

Absorption atomique

La quantité de silice et de calcium dans l'effluent est déterminée par absorption atomique avec un appareil Perkin Elmer, modèle 3030.

pH mètre

La mesure en continu du pH en sortie de colonne est réalisée par un détecteur pH métrique Sensorex (Prolabo).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des sucres par chromatographie liquide peut être réalisée en utilisant les résines échangeuses d'ions Ca^{2+} ou les silices greffées aminopropyles ou octadécyles, les différents systèmes offrant des sélectivités différentes et complémentaires⁸. Sur résines calcium, il est possible d'éluer rapidement les polysaccharides alors que ces derniers ne sont pas élués sur silices aminopropyles avec les teneurs en eau habituelles (20–50%), ni sur silices octadécyles sans l'apport de méthanol à l'éluant aqueux⁸.

Nous choisirons comme système de référence une colonne de silice greffée octadécyle avec de l'eau pure comme éluant. Dans ces conditions, l'effluent donne avec le DDL 11 une quantité de lumière diffusée pratiquement égale à celle obtenue lorsque la pompe est arrêtée. Ceci indique qu'en sortie de colonne, il n'y a aucune entité non évaporable.

Étude des résines échangeuses d'ions Ca^{2+}

Les sucres et les polyols sont analysés avec une bonne sélectivité sur résines Ca^{2+} avec l'eau comme éluant à 80–90°C. Quand la température de la colonne est à 40–60°C, l'effluent aqueux entraîne un signal similaire à celui obtenu avec l'effluent d'une silice greffée octadécyle. Par contre, lorsque cette température augmente jusqu'à 80–90°C, la quantité de lumière diffusée augmente et un bruit de fond plus important que précédemment apparaît⁷. Cela correspond à la sortie de sels de Ca^{2+} , ce qui a été vérifié par absorption atomique. Malgré tout, ce bruit de fond est très régulier. De plus, lors de leur détection, les sucres complexés au calcium engendrent un signal supérieur à celui obtenu en sortie de colonne ODS avec l'eau pure (Fig. 1). Il en résulte un rapport signal sur bruit avec ces mêmes sucres, voisin de celui obtenu sur silice ODS.

Au bout d'un certain temps d'utilisation, les sites SO_3^- du support ayant perdu le co-ion Ca^{2+} deviennent acides et dégradent les sucres rapidement à cette température élevée: la Fig. 2 montre que le saccharose injecté génère *in situ* du glucose et du fructose (Fig. 2b et c), laissant croire à la présence de ces deux monosaccharides dans l'échantillon de saccharose. L'observation de la forme de ces deux pics montre qu'ils n'ont pas la finesse de ceux de glucose et du fructose lorsqu'ils sont injectés avec le saccharose.

Comme le détecteur DDL 11 est sensible, il permet de connaître l'état de la colonne en injectant une solution fraîche de saccharose et en notant l'apparition des pics de glucose et de fructose. Si cela se produit, il convient alors de régénérer la colonne en percolant une solution de nitrate ou d'acétate de calcium. L'injection de saccharose permet de contrôler alors que la régénération a été efficace.

Il faut noter que cette hydrolyse des sucres générée *in situ* sur les sites acides, n'est notable que la température est à 80–90°C: des essais réalisés sur une colonne Ca^{2+} neuve, thermostatée à 80°C, et précédée d'une précolonne remplie de résines H^+ maintenue à 20°C, ont montré qu'il n'y a pas d'hydrolyse du saccharose (Fig. 2d). Au contraire, si la précolonne et la colonne sont chauffées à 80°C, il y a hydrolyse rapide *in situ* du saccharose (Fig. 2e).

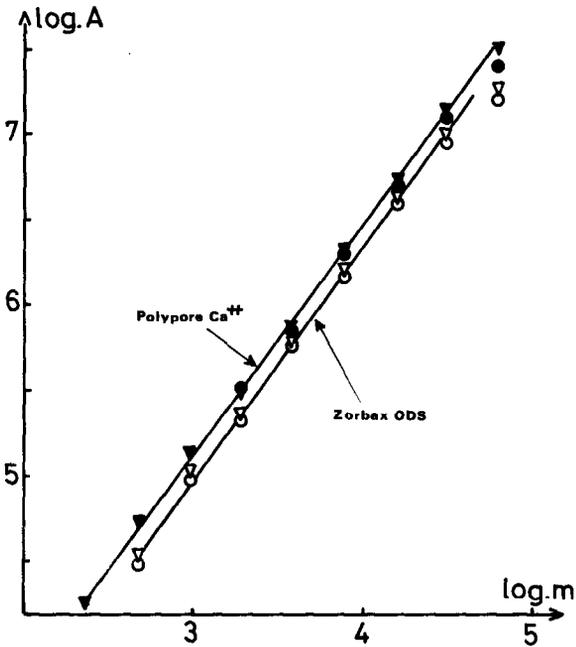


Fig. 1. Courbe de calibration aire (A) du pic en fonction de la quantité injectée (m) en ng pour le glucose (∇ , \blacktriangledown) et le raffinose (\circ , \bullet). Colonnes Polypore Ca^{2+} et Zorbax ODS. Eluant: eau. Détecteur DDL 10. Température du tube évaporateur, 45°C . Pression du gaz nébuliseur, 2,2 bars.

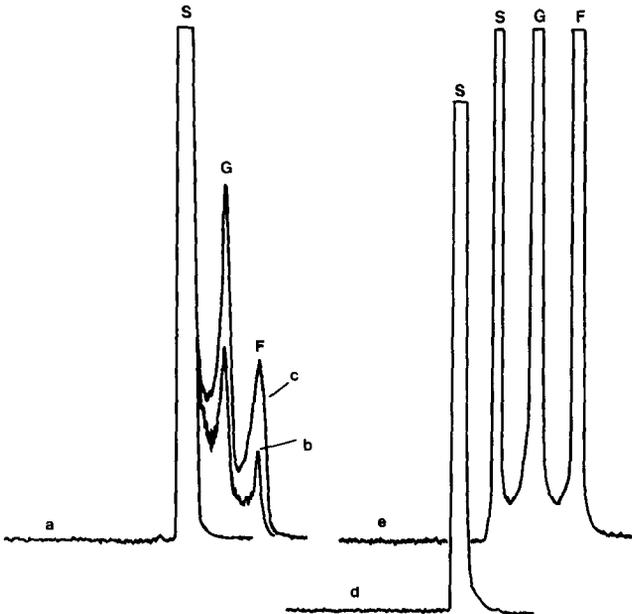


Fig. 2. Analyse du saccharose (S) (28 g/l) sur colonne Sugar Pak. Eluant: eau 80°C . Débit: 0,4 ml/min. (a) Sugar Pak neuve: sans précolonne. (b et c) Sugar Pak usagée: apparition des pics correspondant au glucose (G) et fructose (F) générés *in situ*. (d) Sugar Pak neuve à 80°C avec précolonne Polypore H à 20°C . (e) Sugar Pak neuve et précolonne Polypore H à 80°C . Détecteur DDL 11 réglages voir Fig. 1.

Étude des supports siliceux aminopropyles

C'est le type de support le plus utilisé pour l'analyse des sucres, mais c'est aussi celui que l'on a très vite signalé comme ayant une durée de vie courte: on observe un tassement du support avec apparition de pics dédoublés, occasionnés par un volume mort en tête de colonne.

Comme le détecteur DDL permet de réaliser des gradients acétonitrile-eau, sans dérive de ligne de base⁷, l'analyse de mélanges complexes de sucres (mono-, di-, polysaccharide) devrait être réalisable avec de telle colonne en augmentant la quantité d'eau dans l'éluant.

Le profil d'un tel gradient est montré Fig. 3. On note que lorsque le pourcentage d'eau atteint 30–40%, la ligne de base dérive et le bruit de fond augmente, rendant toute analyse impossible à haute sensibilité. La dérive de la ligne de base correspond à une quantité de lumière diffusée croissante provenant de microparticules non évaporables. Le bruit de fond plus important indique que la quantité de microparticules qui diffusent n'est pas constante même à court terme. Avec un éluant isocratique acétonitrile-eau (65:35), la sensibilité du DDL 11 est limitée à 1 ug environ. Plusieurs supports commerciaux aminopropyles ont été ainsi comparés et tous

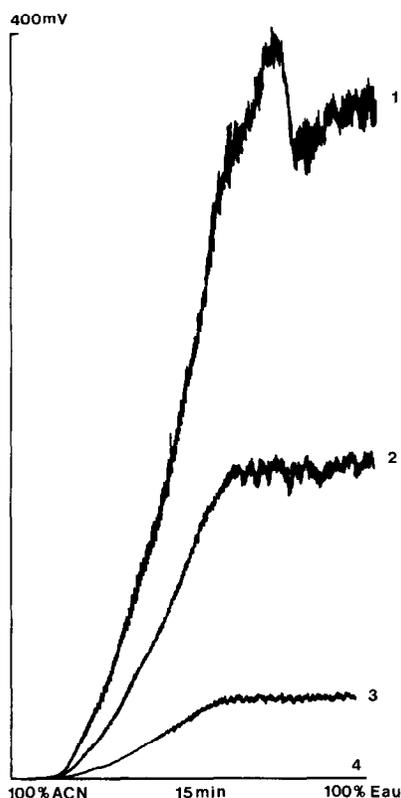


Fig. 3. Dérive de la ligne de base avec les colonnes de silices greffées aminopropyles lors d'un gradient acétonitrile 100% à eau 100%. Débit: 2 ml/min. (1) Lichrosorb NH₂; (2) Nucléosil OH; (3) Zorbax OH; (4) LiChrosorb Diol, Zorbax ODS, Lichrospher Diol. Détecteur DDL 11 réglages voir Fig. 1.

donnent la même caractéristique: les microparticules restantes après l'évaporation de l'éluant créent un bruit de fond important. Pour connaître la nature de ces microparticules, l'effluent des colonnes aminopropyles, avec comme éluant l'eau pure, a été analysé par absorption atomique (Tableau I). En moyenne, l'effluent contient une teneur de 30 ppm en silicium, alors que celui provenant d'une colonne contenant de la silice Zorbax Sil, a une teneur inférieure à 1 ppm, comme dans le cas d'un support greffé apolaire ODS ou TMS (Tableau I).

Cette hydrolyse des supports greffés aminopropyles permet d'expliquer le tassement des colonnes correspondantes. Par contre, la très faible hydrolyse relative de la silice laisse penser que le silicium se trouvant en solution dans l'effluent doit provenir principalement du greffon. Cette coupure probable du greffon n'étant pas un phénomène régulier pourrait expliquer le bruit de fond important contrairement à ce que l'on observe en sortie des colonnes échangeuses d'ions calcium où le départ du calcium du support est un phénomène régulier. Cette hydrolyse doit d'ailleurs limiter également la sensibilité du détecteur réfractométrique, car l'indice de réfraction de l'éluant, même avec thermostatisation, doit dépendre du taux de silicium partant en solution à court terme.

Puisqu'il y a dissolution du support aminopropyle dans l'eau, nous avons voulu voir l'influence du pH et de la force ionique de l'éluant sur cette dissolution. La mesure du pH de l'effluent a été réalisée (Tableaux I et II). Si l'eau distillée à pH 6,3 est percolée à travers la colonne aminopropyle, on note en sortie un pH de 9, sur Zorbax NH₂ et Nucléosil NH₂, alors qu'au contraire il est de 4 sur RSil NH₂ et LiChrosorb NH₂ (Tableau I). Il est curieux de constater que les deux supports sphériques Zorbax et Nucléosil entraînent une augmentation du pH, alors que c'est l'inverse pour ceux de forme irrégulière RSil et LiChrosorb. Une distinction d'après le pH en milieux aqueux entre les silices sphériques et irrégulières a déjà été notée par Engelhardt et Müller⁹.

TABLEAU I
ANALYSE D'EFFLUENT SUR DIFFÉRENTES COLONNES
Eluant: eau distillée à pH 6,3.

<i>Support</i>	<i>pH effluent</i>	<i>Si (ppm)</i>
Zorbax Sil		< 1
Zorbax NH ₂	8,5-9	38
LiChrosorb NH ₂	4,0	41
Nucléosil NH ₂	9,0-9,1	
Waters		24
Carbohydrate		
RSil NH ₂		
Carbohydrate I	4,1	26
Nucléosil OH	4,7	15
LiChrosorb Diol	6,4	< 1
Zorbax OH		< 1
Zorbax ODS	6,1	< 1
Zorbax TMS	6,1	< 1
Waters CN		< 1

TABLEAU II
EFFET DU pH DE L'ÉLUANT AQUEUX SUR COLONNE ZORBAX NH₂

TFA = acide trifluoroacétique; ACN = acétonitrile.

Additif	pH de l'éluant	pH de l'effluent
A -	6,5	8,8
B TFA 10 ⁻⁴ M + HCO ₃ NH ₄	7,0	9,2
C TFA 10 ⁻⁵ M + HCO ₃ NH ₄	7,0	9,2
D TFA	5,15	9,4
E TFA	4,6	9,4
F ACN-H ₂ O (80:20)	5,7*	9,0*
G ACN-H ₂ O (65:35)	6,15*	9,2*
H ACN-B (65:35)	8,15*	9,3*

De façon générale, l'étude réalisée sur des supports greffés de nature différente (ODS, TMS, NH₂, OH, CN) montre que l'hydrolyse représentée par la concentration en silice dans l'effluent existe en même temps que l'on note un écart de pH entre l'éluant et l'effluent.

L'utilisation d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière interdit en général l'adjonction à l'éluant de sels qui engendreraient un bruit de fond trop important. Le DDL 11 autorise l'emploi de composés facilement évaporables comme l'acide trifluoroacétique (TFA) et des mélanges TFA + HCO₃NH₄¹⁰.

Le pH et la force ionique de l'éluant sont modifiés par la présence de ces composés. D'après les résultats du Tableau II obtenus avec le support Zorbax NH₂, on note que quel que soit le pH ou la force ionique de l'éluant, le pH de l'effluent reste de 9 environ, comme en présence de l'eau distillée, ce qui laisse supposer que l'élément en solution provenant de la colonne impose son pH, à la fois par son pKa et sa concentration.

Une mesure en milieu hydroorganique avec l'acétonitrile montre la même augmentation du pH. Dans le Tableau II, la mesure de pH en milieu hydroorganique est notée pH*.

La conclusion de cette étude sur les supports aminopropyles, est que le détecteur évaporatif à diffusion de lumière est un moyen simple pour suivre, comme dans le cas des colonnes Ca²⁺, l'état de fonctionnement de la colonne. L'augmentation de la dérive de la ligne de base étant proportionnelle à la quantité de silice dans l'effluent.

L'emploi du gradient d'éluant acétonitrile-eau avec les silices greffées aminopropyles reste donc délicat, voire impossible, si l'on désire en même temps qu'une analyse performante en sélectivité, une assez bonne sensibilité (30-50 ng).

Étude des silices greffées diol

Plusieurs silices greffées de ce type sont proposées sur le marché et en général pour des analyses de composés autres que les sucres. Elles n'offrent pas l'inconvénient des silices aminopropyles de donner une base de Schiff avec les sucres réducteurs. Leurs greffons, d'après la littérature, sont tous du type -(CH₂)₃-O-CH₂-CHOH-CH₂OH et pourtant leur sélectivité est différente.

Le support Nucléosil OH de Macherey Nagel retient peu les sucres. Il faut donc

employer un éluant (acétonitrile-eau) très faiblement chargé en eau (10%), pour avoir une rétention et une séparation convenables de mono et disaccharides (Fig. 4). Il est alors nécessaire, pour éviter une perte d'efficacité, d'injecter les solutés dans un mélange très riche en acétonitrile, ce qui n'est pas toujours aisé, vu la faible solubilité des sucres en un tel milieu.

Ce support, du fait de la faible rétention des sucres, pourrait convenir pour étudier les polysaccharides, en augmentant la teneur en eau de l'éluant. Ceci doit être fait avec précaution, car l'eau pure hydrolyse ce support (Fig. 3, Tableau I). L'intensité de la lumière diffusée correspond à une perte de silicium plus faible qu'avec les supports aminopropyles. Le signal du bruit de fond obtenu au DDL 11 avec ce support, correspondant à une perte en Si, est malgré tout plus faible qu'avec les supports aminopropyles (15 ppm mesuré par absorption atomique).

Ce support a un autre inconvénient lorsqu'il est utilisé dans l'analyse des sucres. On peut noter une évolution rapide dans le temps de ses performances après un nombre assez faible d'analyses: les chromatogrammes de la Fig. 4 réalisés dans l'ordre du vieillissement de la colonne illustrent cette évolution.

Le chromatogramme I montre une séparation correcte du glucose forme α et du fructose. Après plusieurs analyses, la colonne permet la séparation de mélanges d'anomères α et β de sucres tels que Glucose, Galactose, Lactose, Cellobiose et on peut montrer que ces anomères ne sont pas engendrés au cours de la chromatographie. En effet, une étude a montré que si les sucres sont maintenus dans un solvant organique limitant l'anomérisation tel que le méthanol, la formation d'anomères n'apparaît pas; au contraire on observe les deux pics anomères, si l'on réalise l'anomérisation en milieu aqueux et que l'échantillon est dilué avec de l'acétonitrile (80%), ceci afin d'éviter le dédoublement de pics qui peut se produire chaque fois qu'une trop grande différence entre l'éluant et le solvant d'injection existe. Dans le cas du glucose, on peut même suivre la cinétique de la mutarotation. On en conclut que la colonne Nucléosil OH ne crée pas "in situ" les anomères, mais permet leur séparation.

Cette évolution du support présenterait un intérêt si elle était stable, réversible ou reproductible, ce qui n'est pas le cas. Le Chromatogramme III de la Fig. 4 montre la séparation des anomères α et β du galactose et le Chromatogramme IV montre la même

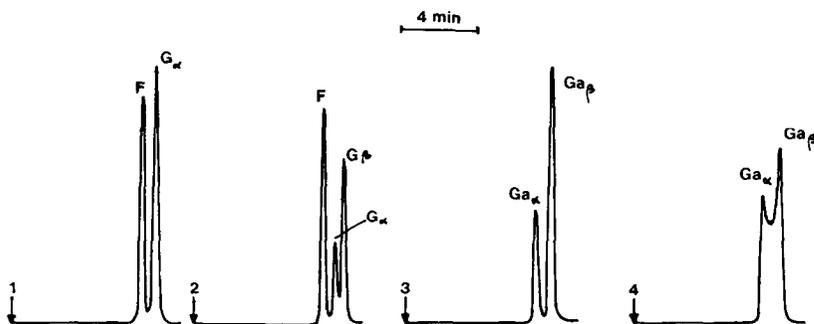


Fig. 4. Evolution au cours du temps d'une colonne Nucléosil OH lors de l'analyse de sucres. (1) Colonne neuve; (2, 3, 4) au cours du vieillissement. Colonne: Nucléosil OH 250 \times 4,6 mm. Eluant: acétonitrile-eau (90:10). Débit: 0,9 ml/min. F = Fructose, G_α = glucose α , G_β = glucose β , Ga_α = galactose α , Ga_β = galactose β . Détecteur DDL 11 réglages voir Fig. 1.

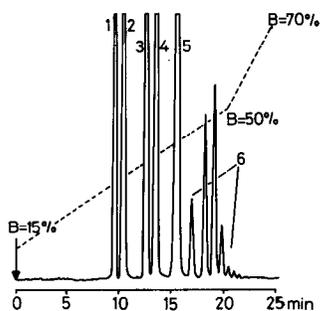


Fig. 5. Analyse d'un mélange de sucres en gradient d'éluion. Colonne: Lichrospher Diol, 250 × 7 mm. Eluant: acétonitrile (A), eau (B). 1 = Fructose; 2 = glucose; 3 = saccharose; 4 = lactose; 5 = raffinose; 6 = dextrans. Détecteur DDL 11 réglages voir Fig. 1.

séparation au bout d'un temps plus long d'utilisation. Des essais de régénération n'ont rien donné et il a été impossible de la ramener à son état initial.

Pour des analyses de sucres ce support n'a pas été retenu, de même que le Zorbax OH non sélectif pour les monosaccharides.

En conclusion de cette étude des supports Diol, seuls les LiChrosorb et Lichrospher Diol offrent une bonne tenue à l'hydrolyse: pas de dérive de ligne de base en gradient (Fig. 3), pas de dissolution du support (Tableau I), pas de phénomène de séparation d'anomères. Ces supports conduisent à une analyse performante des sucres en gradient d'éluion et à une excellente sensibilité avec la diffusion de lumière par microparticules (Fig. 5).

CONCLUSION

La diffusion de lumière par microparticules apparaît non seulement comme un moyen de détection quasi universel mais elle permet en outre de suivre l'état du système chromatographique. L'application au domaine des sucres est illustrée dans ce travail où cette technique offre un moyen de sélection du support chromatographique et un suivi de l'évolution du système.

RÉSUMÉ

Le caractère quasi universel de la détection par diffusion de la lumière par microparticules permet, dans le cas de l'analyse des sucres, de choisir la colonne et de suivre son évolution en fonction du temps. Un test simple est proposé pour prévoir la régénération des résines Ca^{2+} . Le support LiChrosorb Diol est préférable aux silices greffées amino-propyles, si l'on veut réaliser en même temps un gradient d'éluion et une bonne sensibilité (30–50 ng).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. P. Ellis et J. Honeyman, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 10 (1955) 95.
- 2 D. Karlesky, D. C. Shelly et I. Warner, *Anal. Chem.*, 53, no. 13 (1981) 2146.
- 3 J. L. Glajch, J. J. Kirkland et J. Köhler, *J. Chromatogr.*, 384 (1987) 81.
- 4 L. A. Th. Verhaar et B. F. M. Kuster, *J. Chromatogr.*, 220 (1981) 313.

- 5 R. E. A. Escott et A. F. Taylor, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 8 (1985) 290.
- 6 D. M. Wonnacott et E. V. Patton, *J. Chromatogr.*, 389 (1987) 103.
- 7 M. Lafosse, M. Dreux et L. Morin-Allory, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 95.
- 8 M. Lafosse, M. Dreux et L. Morin-Allory, *Analisis*, 15, No. 4 (1987) XLV.
- 9 H. Engelhardt et H. Müller, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 395.
- 10 M. Dreux, en préparation.