

# Séparation par chromatographie sur colonne de silice des glucofructosanes de la série inuline de D. P. entre 1 et 20

G. LABOUREL et C. PÉAUD-LENOËL

*Laboratoire de photosynthèse, C. N. R. S., 91 — Gif-sur-Yvette, France*

La série des inulides du Topinambour (*Helianthus tuberosus*) peut-être séparée en chacun de ses constituants de degré de polymérisation de 1 à 20 environ par chromatographie sur gel de silice en solvant: *n*-butanol—éthanol—eau, à une température voisine de 50°C. Les oligosaccharides séparés sont dosés automatiquement et d'une manière continue à la sortie de la colonne. Il est probable que la méthode pourra être étendue à la séparation de séries d'oligosaccharides divers de degré de polymérisation égal ou plus grand que 20.

A series of inulides from the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) can be separated in its individual components of degree of polymerization from 1 to 20 by using the chromatography on silica gel with a solvent system: *n*-butanol—ethanol—water at a temperature near 50°C. The separated oligosaccharides are determined automatically and continuously at the outlet of the column. This method might be extended and used for the separation of a series of different oligosaccharides with a degree of polymerization equal or exceeding the value of 20.

Les inulides, glucofructosanes de formule générale:  $O-\alpha-D$ -glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $[\beta-D$ -fructofuranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] $_n$ - $\beta-D$ -fructofuranoside forment une série homologue de termes et ne diffèrent entre eux que par le nombre de radicaux fructosyl. *Dedonder* [1] et *Edelman* et coll. [2, 3], par la chromatographie sur papier selon *Partridge* [4] et *Hough* et coll. [5] ont analysé cette série dans le Topinambour. Nous avons cherché à en séparer préparativement les termes jusqu'à un D. P.\* le plus élevé possible.

*Dedonder* [1] a préparé les cinq premiers termes de la série sur une colonne de cellulose. Les colonnes de charbon et kieselguhr selon la technique de *Whistler* et *Durso* [6] conviennent pour les osides de D. P. inférieur à 5. *Edelman* et coll. [2] les ont utilisées pour séparer les monosaccharides et les petits inulides du Topinambour. Plus récemment, *Pontis* [7] a séparé sur une colonne de gel d'acrylamide (Biogel P. 2) les premiers termes des inulides du *Dahlia* jusqu'à un D. P. de 10 environ.

Sur couche mince de silice, *Nash Huber* et coll. [8] ont séparé les 35 premiers maltooligosides montrant ainsi que le gel de silice permet de fractionner des osides de D. P. relativement élevé. Aussi avons-nous choisi comme support le gel de silice, en le mettant dans une colonne afin de séparer des quantités pondérables d'inulides.

---

Communication présentée au colloque franco-tchécoslovaque sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Smolenice (Slovaquie), 29. Septembre — 4. Octobre 1969.

\*D. P. = degré de polymérisation (fructose = D. P. 1, saccharose = D. P. 2, kestose = 1-F fructosyl-saccharose = D. P. 3...).

## Matériel

Le dispositif utilisé est représenté par la figure 1. Il est constitué a) d'une colonne alimentée par un mélange de solvants dont un dispositif mélangeur permet de varier la composition suivant un gradient défini, b) d'un dispositif de dosage automatique du fructose en continu\*.

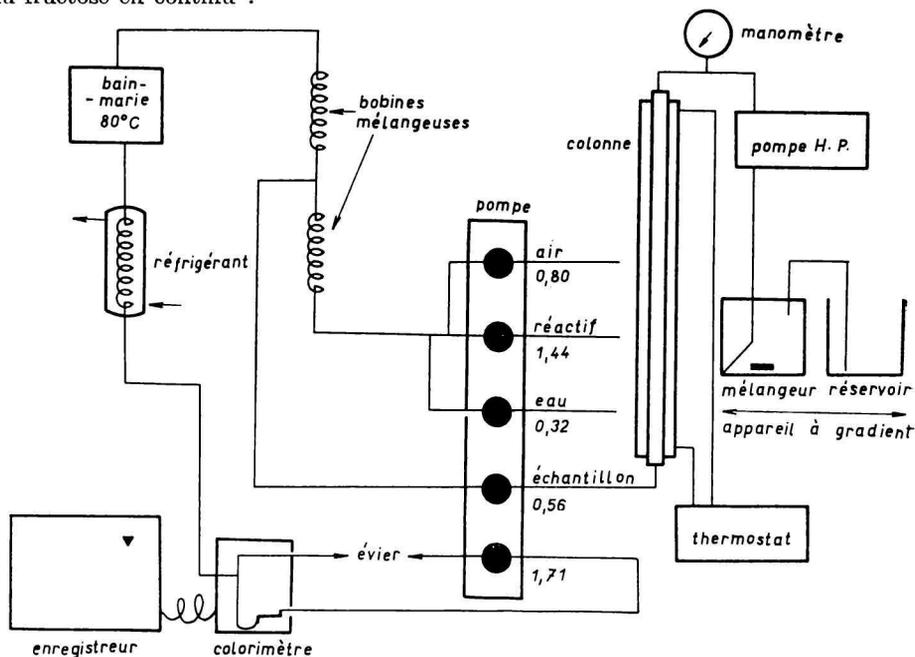


Fig. 1. Schéma du dispositif expérimental.

Les débits à l'entrée de la pompe proportionnante sont exprimés en ml/mn.

La colonne en verre pyrex est cylindrique, de dimensions  $1 \times 20$  cm ou  $1 \times 40$  cm, selon les expériences. Elle est maintenue à température constante par une jaquette d'eau. On remplit la colonne avec une suspension épaisse de gel de silice\*\* dans l'eau. On lave la silice par quatre volumes d'eau distillée dégazée, puis par quatre volumes du mélange de solvants contenu dans le flacon mélangeur. La colonne est alors prête à l'emploi; on dépose à son sommet le mélange à analyser et on la relie à son dispositif d'alimentation. Celui-ci est constitué d'un flacon réservoir et d'un flacon mélangeur dans lequel le volume de solvant reste constant. Le solvant éluant est un mélange de *n*-butanol, d'éthanol et d'eau différent dans le réservoir et dans le mélangeur. On obtient ainsi un gradient de concentration exponentiel pour chacun des constituants du mélange alimentant la colonne. Le solvant du mélangeur est aspiré par une pompe\* qui l'injecte au sommet de la colonne avec un débit constant.

\* Autoanalyseur TECHNICON de Technicon Corporation Ardsley, New York, N. Y. 10502, U. S. A.

\*\* Gel de silice G (Réf. 7731) E. Merck A. G. Darmstadt: Avant l'emploi, nous l'avons décanté, mis en suspension dans HCl 12 N à température ordinaire, lavé à l'eau distillée et dégazé par ébullition.

La sortie de la colonne est reliée à l'entrée d'un dispositif de dosage automatique en continu\* monté pour utiliser le dosage du fructose total décrit par Roë et coll. [9]. Une aliquote de l'éluat y est mélangée à une solution à 400 mg/l de résoresinol dans HCl 12 N. Après passage pendant environ 13 mn dans un bain-marie à 80°C, l'intensité de la coloration est lue en continu à  $\lambda = 520$  nm. La présence de *n*-butanol et d'éthanol ne modifie pas l'amplitude du signal obtenu.

### Partie expérimentale

Le mélange de glucosfructosanes utilisé au cours de ce travail est préparé à partir de tubercules de Topinambour récoltés au début du mois de Novembre et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . On extrait par l'eau à  $100^{\circ}\text{C}$  les inulides des tubercules coupés en tranches fines. La solution obtenue est partiellement purifiée par une défécation au sulfate de zinc et à la baryte et par un passage sur résines échangeuses d'ions.

On dépose la solution des inulides à séparer sur un disque de papier filtre de même diamètre que la colonne et on sèche le disque dans un courant d'air chaud. Le disque de papier est alors placé au sommet de la colonne.

Pour une expérience type, 2,4 mg d'inulides ainsi préparés ont été chromatographiés sur une colonne de dimensions  $1 \times 40$  cm, maintenue à une température de  $51 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . On a fait migrer les inulides avec un solvant progressivement appauvri en *n*-butanol, obtenu en remplissant le mélangeur avec 360 ml du solvant: *n*-butanol—éthanol—eau : 75,3—5,9—18,8 (v/v) et le flacon réservoir avec le solvant: *n*-butanol—éthanol—eau : 44—20—36 (v/v). On a fixé la vitesse d'écoulement du solvant à 1,2 ml/mn. Cette chromatographie d'une durée de 15 heures a consommé environ 1,1 litre de solvant. Le résultat en est donné par la figure 2a; il y apparaît que les 20 premiers termes de la série des glucosfructosanes sont séparés par cette méthode.

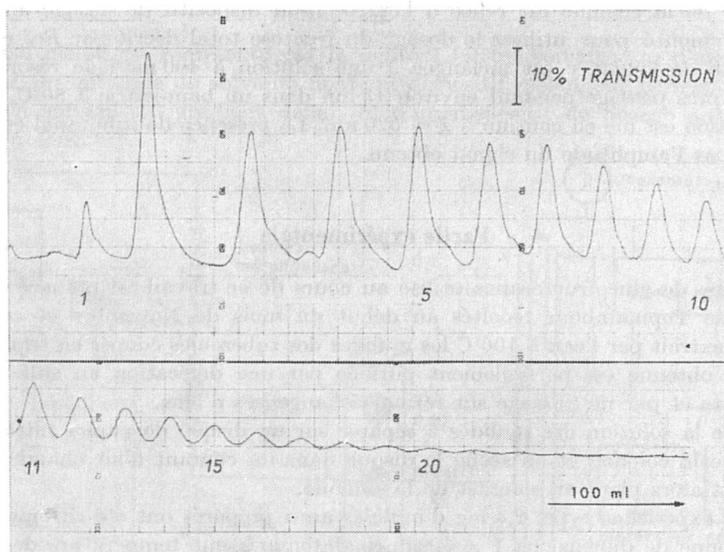
Au cours d'une autre expérience, nous avons chromatographié 2,7 mg d'inulides sur une colonne de 20 cm, avec dans le flacon réservoir le solvant: *n*-butanol—éthanol—eau : 44—30—26 (v/v). (Toutes les autres conditions étant celles de l'expérience type.) Cette chromatographie, dont le résultat est reproduit à la figure 2b a duré 8 heures et consommé environ 600 ml de solvant.

Nous avons réalisé un gradient plus lent en remplissant le flacon réservoir de solvant: *n*-butanol—éthanol—eau : 57—14—29 (v/v) et le mélangeur, comme dans les expériences précédentes, par: 360 ml de ce solvant dans les proportions: 55,3—5,9—18,8. On constate alors un ralentissement de la chromatographie: il faut environ 500 ml de solvant pour éluer les 8 premiers termes de la série. L'écart entre les sommets des pics de l'enregistrement augmente progressivement au cours de la chromatographie et les pics s'étalent.

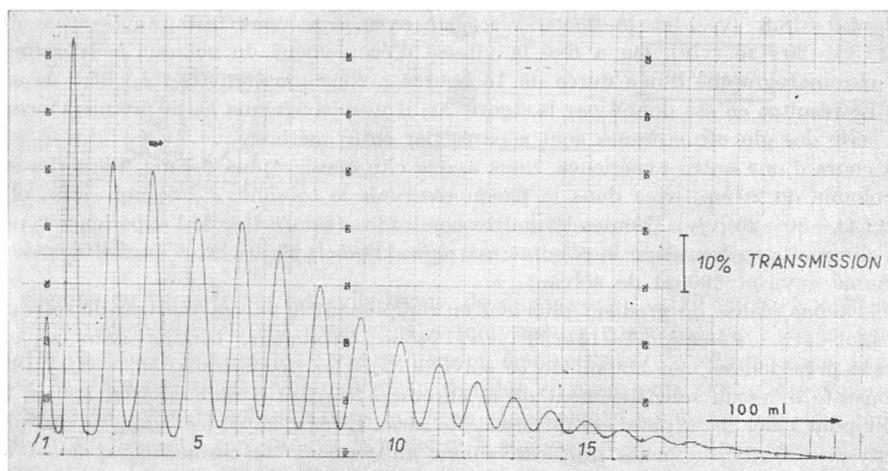
Si, au contraire, l'élution se fait avec un solvant où la concentration de butanol baisse rapidement (réservoir contenant un mélange: éthanol—eau : 19—81 (v/v), le mélangeur étant rempli comme précédemment), 250 ml environ de solvant suffisent à éluer les 15 premiers termes et l'enregistrement présente un chevauchement des pics. ■

### Discussion

Pour séparer complètement les premiers termes de la série étudiée, il faut un solvant très riche en *n*-butanol. Ce solvant, entraînant mal les inulides de D. P. supérieur à 4, nous l'avons progressivement appauvri en *n*-butanol au cours du



a



b

*Fig. 2.* Chromatogrammes d'extrait glucidique de tubercules de Topinambour. Le premier pic à gauche représente le fructose, le deuxième le saccharose, etc.

Les nombres figurant sous les pics indiquent le D. P.

a) Gradient: *n*-butanol-éthanol-eau, de : 75,3-5,9-18,8 à 44-20-36.

Colonne: longueur 40 cm, diamètre 1 cm, température 51°C.

Débit 1,2 ml/mn, charge 2,4 mg.

b) Gradient: *n*-butanol-éthanol-eau, de : 75,3-5,9-18,8 à 44-30-26.

Colonne: longueur 20 cm, diamètre 1 cm, température 51°C.

Débit 1,2 ml/mn, charge 2,7 mg.

développement de la chromatographie. Pour conserver une relative équidistance entre les pics, la concentration de *n*-butanol doit baisser plus rapidement au début de la chromatographie qu'à la fin; c'est pourquoi nous avons choisi le dispositif à gradient exponentiel décrit plus haut. La concentration de *n*-butanol en fin de chromatographie devra tendre vers des valeurs de l'ordre de 40 à 45 volumes pour 100 volumes de solvant.

Le solvant du mélangeur doit être aussi pauvre que possible en éthanol pour obtenir la séparation des premiers inulides. Si on remplit le flacon réservoir avec un solvant où une partie de l'eau est remplacée par de l'éthanol, on réduit nettement la durée des chromatographies tout en ne diminuant que légèrement la qualité des séparations.

Une colonne de dimensions 1 × 20 cm permet la séparation complète des 20 premiers inulides, pourvu que la quantité de mélange à analyser n'excède pas 4 mg; en doublant la longueur de la colonne, sans changer les autres conditions, on multiplie la durée de la chromatographie par un facteur d'environ 1,2 et on améliore la qualité de la séparation, ce qui permet de porter à 7 mg la charge maximale. Au-delà de cette charge, les pics se chevauchent mais ne semblent pas former de traînées.

La température de la colonne conditionne assez étroitement la qualité de la séparation. Si on opère à 47°C ou à 57°C au lieu de 51°C, les séparations sont nettement moins bonnes.

Sur la figure 2a apparaissent des épaulements ou des pics surnuméraires, peut-être dus à des fructosides différents de ceux de la série principale des inulides. Nous n'avons pas encore analysé ces produits mineurs qui sont mal séparés de la série principale par notre technique.

La méthode proposée ici n'est pas exempte de difficultés. Tout d'abord, la reproductibilité des résultats n'est pas parfaite. En effet, la qualité des séparations est très largement fonction des propriétés du gel de silice qu'il est difficile de reproduire exactement. De plus, le gel de silice possède une capacité d'absorption relativement faible. Enfin, le pouvoir séparateur est sensible à de faibles variations de la composition du solvant éluant.

En dépit de ces inconvénients, cette méthode présente des avantages certains. Elle est rapide. Elle est aussi très séparante, permettant d'isoler des termes de D. P. élevé en quantité suffisante pour étudier les caractéristiques et les propriétés de chacun d'eux. Elle permet, de plus, de contrôler et de corriger la qualité de la séparation en cours d'expérience. Enfin, il est possible probablement de l'étendre à d'autres séries d'oligosaccharides homologues.

### Bibliographie

1. Dedonder R., *Thèse de doctorat*, p. 16 à 20. Paris, 1952.
2. Edelman J., Jefford T. G., *Biochem. J.* **93**, 148 (1964).
3. Edelman J., Dickerson A. G., *Biochem. J.* **98**, 787 (1966).
4. Partridge S. M., *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).
5. Hough L., Jones J. K. N., Wadman W. H., *J. Chem. Soc.* **1950**, 1702.
6. Whistler R. L., Durso D. F., *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 677 (1950).
7. Pontis H. G., *Anal. Biochem.* **23**, 331 (1968).
8. Nash Huber C., Scobell H. D., Han Tai, Fisher E. E., *Anal. Chem.* **40**, 207 (1968).
9. Roë J. H., Epstein J. H., Goldstein N. P., *J. Biol. Chem.* **178**, 839 (1949).