

**MÉTHODE RAPIDE POUR LA DÉTERMINATION
PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE
DES GLUCIDES DU NECTAR : TECHNIQUE
DE PRÉLÈVEMENT DU NECTAR ET DE PRÉPARATION
DES ÉTHERS TRIMÉTHYLSIYLES EN PRÉSENCE D'EAU**

*Ein Schnellverfahren zur Bestimmung der Zucker im Nektar mit Hilfe
der Gas Chromatographie : Technik der Nektarentnahme und Herstellen
der Trimethylsilyl-Ester in Anwesenheit von Wasser*

Girolamo BOSI

Istituto di Zoocolture Università-Perugia (Italie)

SUMMARY

**A RAPID METHOD OF DETERMINATION BY GAZ CHROMATOGRAPHY
OF NECTAR GLUCIDS**

A rapid method of determination by gas chromatography of nectar glucids is described. The nectar is drawn by centrifugation at 3 000 t/min of the flowers in centrifugal tubes provided with screw on caps and teflon seals, containing a layer of about 5 mm of glass microspheres and a flock of backwashed cotton.

After partial dehydration of sample in the drier, in a vacuum, the author proceeded to the preparation of the trimethylsilylethers in the same centrifugal tube, adding the reagents : pyridine (1 ml), hexamethyldisilazane (0,9 ml) and trifluoroacetic acid (0,1 ml).

The tube was closed with its cap and agitated for a few minutes; it was then left to rest overnight.

The author obtained the complete derivatization of the mono, bi, and trisaccharides, which were subjected to gas chromatographic analyses at programmed temperature using pyrex glass columns of 2,5 m × 3 mm and OV 17 at 3 % on chromosorb G as a stationary phase.

RÉSUMÉ

On décrit une méthode rapide pour la détermination par chromatographie en phase gazeuse des glucides du nectar.

Le nectar est prélevé par centrifugation à 3 000 t/mn des fleurs dans des tubes à centrifuger à vis bouchés avec garniture en téflon, contenant une couche de 5 mm environ de microsphères en verre et un tampon de coton dégraissé.

Après déshydratation partielle de l'échantillon dans un dessiccateur, sous vide, on a procédé à la préparation des trimethylsilyléthers dans le même tube à centrifuger, en ajoutant les réactifs : pyridine (1 ml), hexamethyldisilazane (0,9 ml) et acide trifluoroacétique (0,1 ml).

On ferme le tube par son bouchon et l'on agite pour quelques minutes; après, on laisse reposer pendant une nuit.

On obtient une dérivatisation complète des mono-, bi-, et trisaccharides qui sont analysés par chromatographie en phase gazeuse à température programmée, en employant des colonnes en verre pyrex de 2,5 m \times 3 mm et OV 17 à 3 % sur chromosorb G comme phase stationnaire.

INTRODUCTION

Les difficultés que l'on rencontre en général dans le prélèvement direct du nectar des fleurs et les quantités minimales de matériel que l'on peut obtenir par les systèmes traditionnels représentent des facteurs limitatifs pour l'étude du nectar.

Les techniques de plus large emploi ont recours à des micropipettes par lesquelles on aspire les petites gouttes de nectar adhérentes aux tissus glandulaires. Dans la plupart des espèces végétales, pour obtenir quelques milligrammes de matériel il faut un nombre exceptionnellement élevé de fleurs. D'ailleurs la sécrétion est souvent si petite que le problème de la trouver devient plus ardu que la recherche même.

Pour ces raisons, dans cet Institut on a essayé plusieurs fois de mettre au point des techniques moins complexes.

Dans des recherches précédentes on a eu recours au lavage par l'eau d'un certain nombre de fleurs (de 10 à 20), au filtrage et ensuite à l'évaporation des extraits sous vide, à basse température sur évaporateur tournant. Ce mode opératoire facilitait considérablement le prélèvement du nectar, mais l'évaporation de l'eau restait un problème non seulement très ennuyeux mais aussi très délicat, parce que l'on devait travailler à basse température pour ne pas modifier la nature chimique des glucides mêmes du nectar.

Après de nombreux essais on a mis au point une technique simple et rapide que l'on décrit ci-après.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Prélèvement du nectar

- 1) tubes à centrifuger à vis bouchés de 16 mm \times 100 avec garniture en téflon;
- 2) microsphères de verre d'un diamètre de 2 mm environ;
- 3) centrifugeuse de laboratoire (vitesse 3 000 t/mn).

On dépose dans le tube les sphères de verre jusqu'à une hauteur de 5 mm environ; on superpose un tampon de coton dégraissé et l'on étend délicatement les fleurs, si possible retournées. Lorsqu'on a rempli le tube, l'on centrifuge à 3 000 t/mn pendant 5 mn; le nectar se dépose au fond.

On enlève les fleurs avec une pince fine, puis le tampon de coton qui, pendant sa montée, traînera le pollen et les fragments végétaux adhérents aux parois du tube. Le nectar extrait est en partie déshydraté, en le gardant sous vide pendant une nuit en dessiccateur (sur CaCl_2 , Drierite ou un autre déshydratant).

Préparation des éthers triméthylsilyles

La technique traditionnellement employée est celle bien connue de SWEELEY et *al.* (1963), adoptée par POURTALLIER (1967) pour les miels et par d'autres auteurs pour les miels et les nectars. Elle s'applique à un échantillon parfaitement anhydre, en utilisant comme réactifs la pyridine, l'hexaméthylidisilazane et le triméthylchlorosilane.

A la technique susdite on a préféré celle de dérivatisation proposée par K.-M. BROHST et C.-E. LOTT Jr. (1966), applicable à des échantillons qui contiennent jusqu'à 40 mg d'eau.

Réactifs :

- 1) Pyridine pure pour analyse, redistillée sur potasse;
- 2) Hexaméthylidisilazane pur pour analyse;
- 3) Acide trifluoracétique pur pour analyse.

Les modalités d'exécution sont les suivantes :

- a) 10-20 mg de nectar (maximum 50 mg), partiellement déshydraté, sont dissous dans 1 ml de pyridine, que l'on introduit dans le tube qui contient le nectar et les sphères de verre. Si la quantité de nectar est supérieure à 50 mg on utilise une quantité proportionnellement plus grande de pyridine; on transfère ensuite 1 ml de la solution dans un autre tube;
- b) On ajoute 0,9 ml de hexaméthylidisilazane;
- c) On ajoute 0,1 ml d'acide trifluoracétique;
- d) On ferme hermétiquement le tube à vis bouché et on agite énergiquement pendant 1 mn puis on laisse reposer. Au bout de 15 mn on vérifie la complète dérivatisation des mono- et disaccharides; celle des trisaccharides demande une durée de 5 h. Il sera donc convenable de laisser reposer toute la nuit. On obtient une solution parfaitement limpide, sans précipités, que l'on peut prélever par la microseringue et injecter. Cette méthode évite la corrosion et l'obstruction des aiguilles des seringues ce qui est un avantage non négligeable compte tenu de leur coût élevé.

Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Les analyses ont été exécutées sur gaz-chromatographe Carlo Erba mod. GI, à double colonne et double détecteur à ionisation de flamme et programmeur linéaire de température.

Colonnes en verre pyrex de 2,5 m \times 3 mm de diamètre intérieur.

Phase stationnaire : OV 17 à 3 % sur chromosorb G lavé aux acides et silanisé.

Température de la colonne : programmée de 190° C à 295° C, avec une progression de 3° C par minute.

Température du détecteur et de l'injecteur : 290° C.

Gaz de transport : azote à la pression de 2,5 kg/cm₂ à 190° C.

Enregistreur : Speedomax W, 5 mV fond échelle, à la vitesse de 12 pouces/h.

Quantité injectée : 0,5 — 2 μ l avec une atténuation de 100 \times 4 ou tout autre convenable.

La méthode a été expérimentée sur quelques centaines d'échantillons pour une recherche encore en cours d'exécution sur les glucides des nectars.

Reproductivité

Un mélange standard de mono-, bi- et trisaccharides (v. chromatogramme 1) additionné d'une quantité d'eau égale à 20 % de son poids, a été soumis à silanisation et analysé au gaz-chromatographe après 5 h, 20 h, 5 jours et 10 jours, avec des résultats parfaitement comparables.

Calcul des pourcentages relatifs

Evaluation quantitative

Le calcul des pourcentages relatifs des différents composants d'un mélange peut être effectué par la formule suivante :

$$C_1\% = \frac{100 h_1 f_1}{(h_1 f_1 + h_2 f_2 + \dots + h_n f_n)}$$

où $h_1; h_2 \dots h_n$ sont les hauteurs de chaque pic et $f_1; f_2 \dots f_n$ sont les facteurs de correction des hauteurs respectives.

Les f sont calculés expérimentalement sur un chromatogramme d'un mélange standard des différents sucres à égale concentration, en faisant le rapport entre la hauteur d'un pic et celle de tous les autres pics.

Exemple : si h_A, h_B, h_C sont les hauteurs des pics d'un mélange des composants A, B, C, à égale concentration, les facteurs de correction de h_A, h_B et h_C seront respectivement :

$$\frac{h_C}{h_A} ; \frac{h_C}{h_B} ; \frac{h_C}{h_C} = 1.$$

Lorsqu'on a vérifié la cohérence de réponse du détecteur pour les quantités d'échantillons injectées, si l'on maintient rigoureusement constantes les conditions de travail, même les facteurs de correction restent inchangés.

Reçu pour publication en Novembre 1972.

Eingegangen im November 1972.

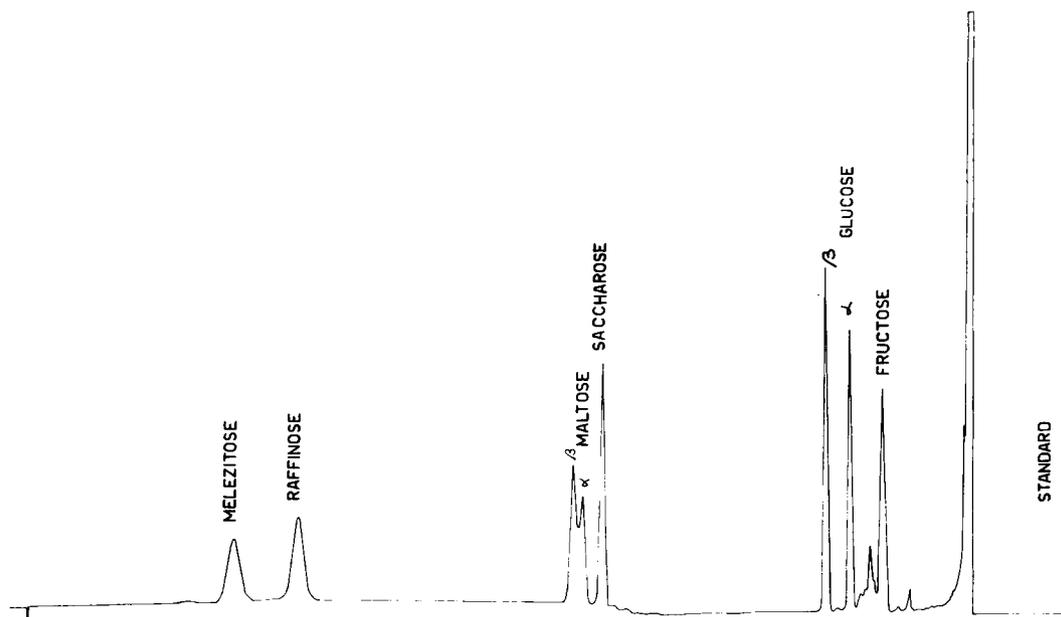


FIG. 1

FIG. 1. — *Mélange standard de mono-, di- et trisaccharides.*

ABB. 1. — *Standardmischung von Mono-, Di- und Trisacchariden.*

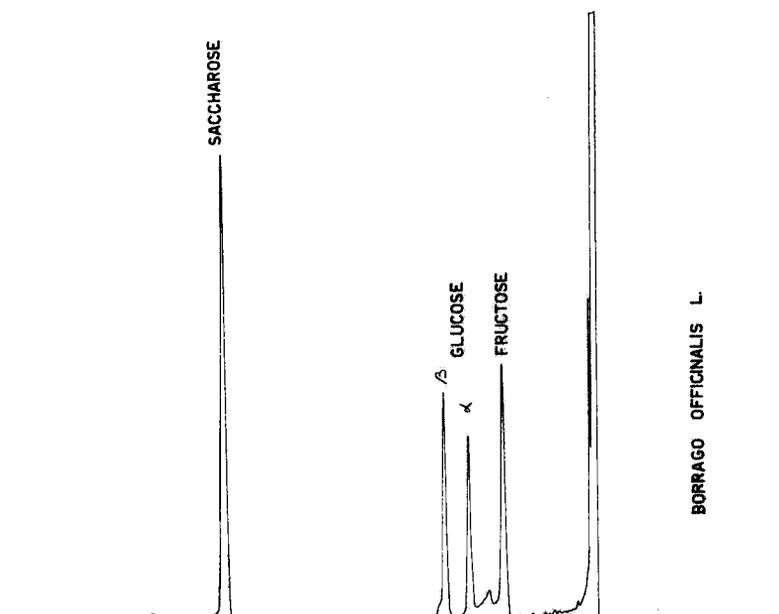


FIG. 2

FIG. 2. — *Nectar de Borago officinalis L.*
 ABB. 2. — *Nektar von Borago officinalis L.*

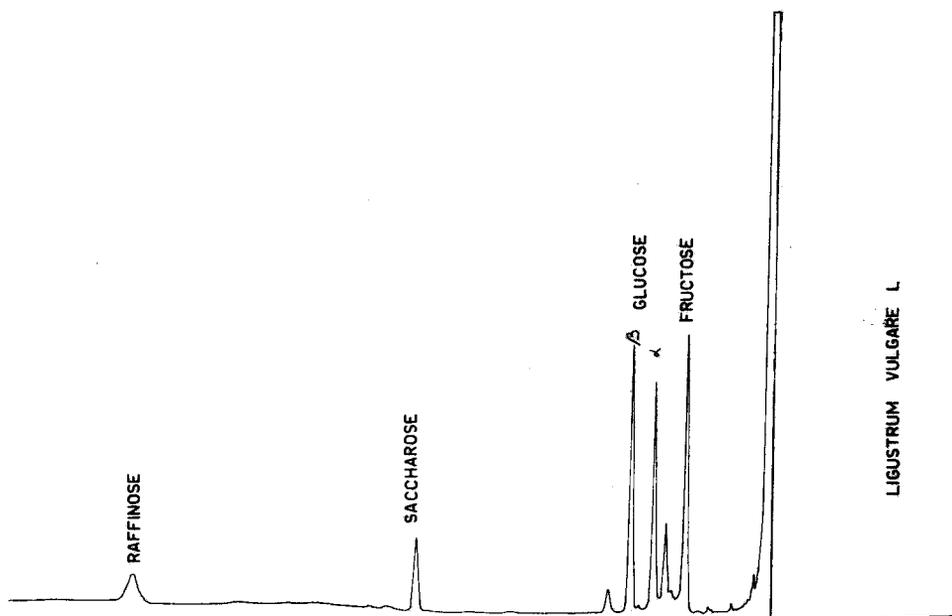


FIG. 3

FIG. 3. — *Nectar de Ligustrum vulgare L.*
 ABB. 3. — *Nektar von Ligustrum vulgare L.*

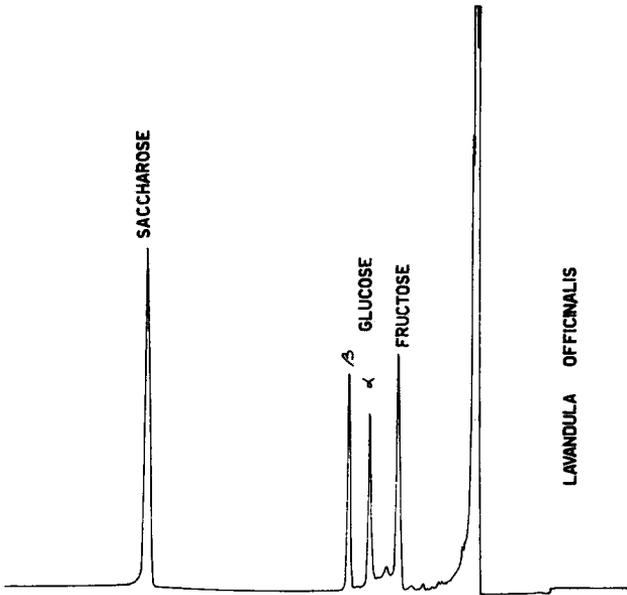


FIG. 4

FIG. 4. — *Nectar de Lavandula officinalis (Chaix).*
ABB. 4. — *Nektar von Lavandula officinalis (Chaix).*

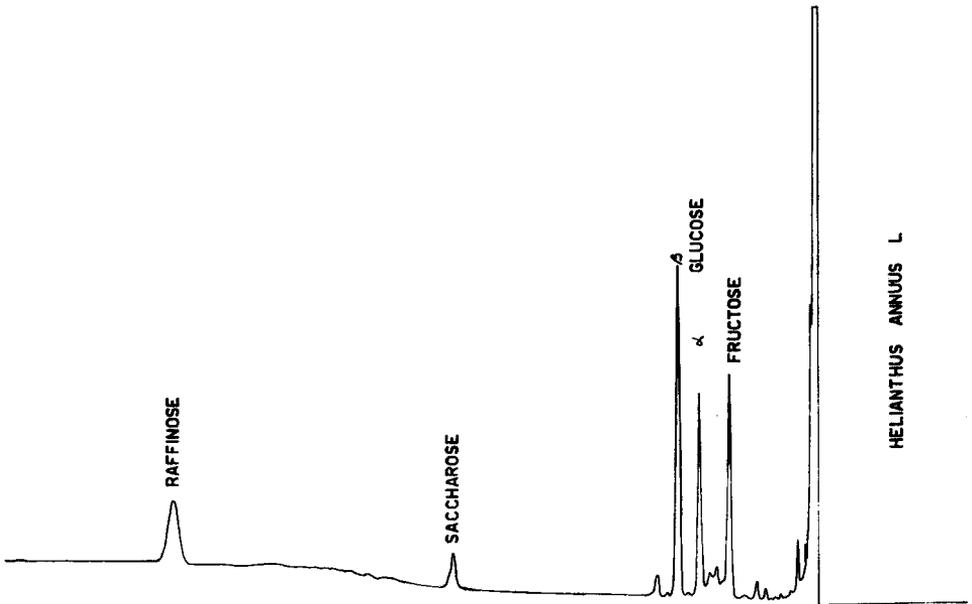


FIG. 5

FIG. 5. — *Nectar de Helianthus annuus L.*
ABB. 5. — *Nektar von Helianthus annuus L.*

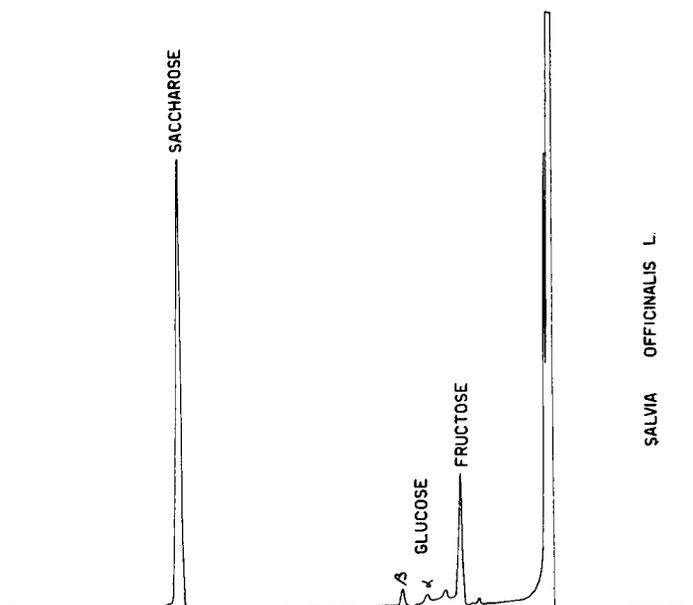


FIG 6

FIG. 6. — *Nectar de Salvia officinalis L.*

ABB. 6. — *Nektar von Salvia officinalis L.*

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Schnellverfahren zur Analyse der verschiedenen Zucker im Nektar mittels der Gas-Chromatographie wird beschrieben. Die Untersuchungen erstrecken sich auf folgende Punkte :

a) Technik der Entnahme des Blütennektars.

In ein Zentrifugenröhrchen von 10 cm Länge und 16 mm Durchmesser mit Schraubverschluss und Teflondichtung gibt man etwa 5 mm hoch Mikrogaskügelchen und einen entfetteten Wattebausch. Dann füllt man das Röhrchen lose mit den Blüten und zentrifugiert 5 Min lang bei 3 000 U/min. Der Nektar sammelt sich hierauf in kleinen Tropfen am Grunde des Röhrchens.

b) Herstellungsmethode der Trimethylsilyl-Ester in Anwesenheit von Wasser.

Nach Entnahme der Blüten und der Watte lässt man das Röhrchen mit dem Nektar und den Glaskügelchen über Nacht im Vakuum im Trockenapparat stehen.

Die Derivation des teilweise dehydrierten Nektars erfolgt hierauf im gleichen Zentrifugenröhrchen unter Zugabe folgender Reagenzien : Pyridin (1 ml), Hexamethyldisilazan (0,9 ml) und Trifluor-Essigsäure (0,1 ml).

Nachdem das Röhrchen durch einen Stopfen verschlossen wurde, schüttelt man es einige Minuten lang heftig und lässt es danach wieder über Nacht ruhen. So erfolgt die vollkommene Trennung der Mono-, Di- und Trisaccharide, die man sofort durch Gas-Chromatographie bestimmen kann.

c) Gas-Chromatographie bei programmierter Temperatur.

Es wurde ein Gas-Chromatograph mit doppelter Säule aus Pyrexglas von 2,5 m × 3 mm und doppeltem Flammen-Ionisations-Detektor benutzt.

Stationäre Phase 3 % OV 17 auf Chromosorb G. Injizierte Menge 0,5 — 2 ul bei einer Verdünnung von 100 : 4.

Die Untersuchung erstreckte sich auf Chromatogramme der Zucker in den Nektaren einiger Pflanzenarten sowie einer Standardmischung aus Mono-, Di- und Trisacchariden.

Ausser den Monosacchariden Fruktose und Glukose, dem Disaccharid Saccharose wurden gelegentlich die Trisaccharide Raffinose und Melezitose festgestellt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BATTAGLINI M., BATTAGLINI M., 1971, Apimondia. Le XXIII^e Congrès International d'Apiculture, Résumés des rapports, Moscou, 13.

BATTAGLINI M., BOSI G., 1972, *Apiacta* VII, (1), 5-8.

BRITTAIN G.-D., SCHEWE L., 1971, Schewe, Recent Advances in Gas Chromatography, 1.1. Domsy and J.-A. Perry, editors, Marcel Dekker. Inc., New-York, N. Y.

BROBST K.-M., LOTT C.-E. Jr., 1966, *Cereal Chemistry* 43, 35-43.

PIERCE CHEMICAL COMPANY, 1972, Handbook of Silylation, Rockford Illinois, 1.

POURTALLIER J., 1967, *Bulletin Apicole*, n° 2, Ministère de l'Agriculture.

SWEELEY C.-C., BENTLEY R., MAKITA M., WELLS W.-W., 1963, *JACS* 85, 2495-2507.
