

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION : CARACTERISATION DES PROTEINES ET AUTRES CONSTITUANTS

Jean-Claude AUTRAN, Laboratoire de Technologie des Céréales,
I.N.R.A., 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1

Introduction

Les propriétés remarquables des blés et des farines en font des aliments de base pour la majeure partie de l'humanité. Néanmoins, notre connaissance des propriétés physicochimiques de leurs principaux constituants, particulièrement de leurs protéines, est loin d'être complète.

L'un des objectifs des chimistes céréaliers est donc de parvenir à une meilleure connaissance des constituants qui déterminent la valeur technologique, à la fois en vue d'un meilleur contrôle de la qualité des matières premières (identification des variétés), du comportement des produits en cours de fabrication, ainsi que du contrôle de la qualité des produits finis. Egalement, en amont de la filière "céréales", cette connaissance pourra être appliquée à la prédiction de la qualité lors de la création et de la sélection des nouvelles variétés.

De nombreuses techniques ont été utilisées pour isoler et caractériser les constituants des blés et des farines. Dans le cas des protéines, on connaît ainsi deux techniques majeures : l'électrophorèse et la chromatographie. En électrophorèse, comme on l'a vu dans l'exposé précédent, les protéines se déplacent au travers d'une matrice poreuse (généralement un gel de polyacrylamide) sous l'effet d'un champ électrique, la séparation des constituants protéiques étant déterminée par leurs différences de taille moléculaire et/ou de charge électrique nette. En chromatographie liquide, c'est un flux de solvant qui transporte les protéines au travers d'une colonne contenant le support chromatographique, support avec lequel les protéines vont interagir à des degrés différents : en raison de leur taille, de leur charge électrique, ou encore de leurs caractéristiques d'hydrophobicité.

De nombreuses variantes de ces techniques ont été décrites. Certaines ont de multiples inconvénients : lenteur (plusieurs heures, parfois plus de 24 heures, pour analyser un échantillon) ; difficulté à reproduire les séparations obtenues ; faible résolution (chromatographie d'exclusion-diffusion) ; difficulté de quantifier les résultats (densitométrie des électrophorégrammes). Des erreurs peuvent aussi provenir de différences dans la manière selon laquelle les colonnes sont préparées, ou les gels d'électrophorèse polymérisés.

Au cours des dernières années, surtout depuis le début des années 80, des types entièrement nouveaux de colonnes chromatographiques ont été inventés, utilisant le plus souvent des supports de silice. Ces nouvelles colonnes, de petite taille, chimiquement stables, supportant des pressions élevées, ont permis d'obtenir des séparations avec une résolution jusque là inégalée et un temps très

Conférence au Séminaire de formation C.P.C.I.A. "Blés et farines : Caractérisations Technologiques, Physicochimiques, Moléculaires", 17-19 Septembre 1991, Montpellier.

court. On assista alors à un développement considérables de ces technique, appelées "chromatographie liquide à haute pression", ou "chromatographie liquide à haute performance" (CLHP).

A l'origine, la CLHP ne pouvait être utilisée que sur des constituants de faible poids moléculaire (lipides, pigments, vitamines, acides aminés, etc.). Jusque vers 1982, aucune constructeur ne pouvait proposer de colonne qui soit en mesure de séparer des protéines : au delà de poids moléculaires de 10 000, les protéines ne pouvaient pas pénétrer dans le supports ou, fréquemment, s'y adsorbaient de façon irréversible. Ce n'est que vers 1983-1984 que des colonnes à larges pores (300 Å ou davantage) sont devenues disponibles et ont permis de séparer des protéines à partir de leurs caractéristiques de taille, de charge ionique, ou d'hydrophobicité.

I - QUELQUES RAPPELS SUR LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1.1 - La chromatographie classique

1.1.1 - Principe

Il s'agit de la réalisation d'un tri entre les différentes espèces moléculaires d'un mélange.

On va ainsi forcer toutes les molécules à effectuer un parcours commun parsemé d'obstacles : certaines espèces le franchiront aisément, d'autres avec difficulté. A l'arrivée, il y aura échelonnement. Pour entraîner les molécules, il faut les véhiculer dans un fluide : la **phase mobile**, qui peut être soit un liquide, soit un gaz. L'obstacle à franchir, qui ne doit pas être entraîné par la phase mobile, doit être fixe et produire des effets reproductibles. Il constitue la **phase stationnaire**. Cette phase stationnaire, le plus souvent emprisonnée dans une colonne, peut être un solide, ou un liquide immobilisé sur un solide.

Les facteurs qui contrôlent la séparation sont surtout d'ordre thermodynamique : la rétention de l'échantillon sur la colonne est donc contrôlée thermodynamiquement. En pratique, la séparation idéale n'est pas réalisable : il se produit en effet un élargissement des bandes en raison surtout des phénomènes de diffusion. Les facteurs qui contrôlent la diffusion sont surtout de nature cinétique et peuvent être considérés indépendamment des facteurs thermodynamiques qui influencent la rétention.

Les performances séparatives de la chromatographie dépendent par ailleurs d'un certain nombre de paramètres. Le premier à prendre en considération est la **nature des constituants à séparer et leurs caractéristiques intrinsèques**. En fonction des caractères prédominants, il sera alors possible de choisir le type de chromatographie le plus adapté, ou les meilleurs combinaisons chromatographiques. Le deuxième paramètre à considérer est le **degré de "contamination"** du constituant à séparer (concentration relative par rapport aux constituants à éliminer). Le troisième paramètre important est la **concentration de la protéine dans le milieu ainsi que le pH et la force ionique de ce dernier**.

1.1.2 - Classification des méthodes chromatographiques

On a l'habitude de classer les méthodes chromatographiques, soit selon la nature des phases (exemple : phase liquide, phase gazeuse, gaz/solide, liquide/liquide, etc.), soit selon la technique mise en jeu (chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince, etc.), soit enfin selon les phénomènes mise en jeu. C'est cette dernière classification que nous détaillerons. Elle permet en effet de distinguer les types suivants de méthodes chromatographiques :

1) La chromatographie d'adsorption

C'est la plus ancienne et "encore" la mieux connue. La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et de désorption de la phase stationnaire. Il s'agit d'une chromatographie liquide-solide (CLS).

2) La chromatographie d'échanges d'ions

La phase stationnaire est ici un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés. Un soluté ionisé de charge opposée se trouvera d'autant plus retenu que sa charge (opposée à celle de la phase stationnaire) sera plus forte. Il n'y a pas de phase stationnaire idéale : tout ion a forcément un support, de sorte qu'il existe toujours plus ou moins un phénomène d'adsorption dans cette chromatographie. La phase stationnaire solide est généralement poreuse et renferme dans ses pores une phase liquide qui peut jouer un rôle très important dans les séparations. On peut ainsi parler pour ce type de chromatographie de CLS, mais aussi de CLL.

3) La chromatographie de partage

La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui, en fait, imprègne ou est greffée sur un solide), Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide (CLL). Cette technique revient à multiplier les partages entre phases de la même façon que si l'on disposait de plusieurs milliers d'ampoules à décanter contenant deux solvants non miscibles.

4) La chromatographie d'exclusion-diffusion, ou chromatographie de perméation sur gel, ou encore de "gel filtration"

La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle des molécules à séparer. Celles qui sont trop volumineuses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées les premières, les autres étant plus ou moins retardées. Ici encore, on peut parler indifféremment de CLS ou de CLL.

5) La chromatographie d'affinité

Très utilisée par les biochimistes, elle consiste à fixer sur la phase stationnaire un type de molécule capable de reconnaître une autre molécule avec une spécificité très élevée. On va greffer, par exemple, une enzyme, qui va complexer sélectivement le substrat correspondant (ou *vice versa*), on encore un anticorps, qui reconnaîtra l'antigène correspondant dans la phase mobile

1.1.3 - Etude plus détaillée des techniques de chromatographie liquide en usage pour les constituants des blés et des farines

1) La chromatographie d'échanges d'ions

La phase stationnaire est ici un support insoluble contenant des groupements chargés. Ceux d'un certain type sont fixés car liés chimiquement, les autres de signe opposé sont mobiles. Ces derniers peuvent être échangés réversiblement avec d'autres ions de même charge sans aucun changement de la partie insoluble.

Les groupes ioniques fixes déterminent le type et la force de l'échangeur. Leur nombre et leur accessibilité déterminent la capacité. Le pH de la phase mobile est ici le paramètre principal de la rétention. La nature et la concentration du contre-ion sont également importantes puisqu'elles déterminent la force d'élution du tampon utilisé pour "décrocher" les protéines.

Les principaux groupements fonctionnels utilisés sont de type : sulfonate, phosphonate, ou carboxylate pour les échangeurs de cations, et de type : ammonium quaternaire, tertiaire ou secondaire pour les échangeurs d'anions. Les groupes de type sulfonate ou ammonium quaternaire sont des échangeurs d'ions forts, les autres, des échangeurs faibles.

Il existe par ailleurs différents types de matrices : type polystyrène, dextrane, cellulose et silice. Les plus utilisées ont longtemps été les CMC (carboxyméthyl-celluloses), SEC/SPC (sulfoéthyl- ou sulfopropyl-celluloses, pour les échangeurs de cations, et les DEAE (diéthylaminoéthyl-celluloses) pour les échangeurs d'anions.

2) La chromatographie de partage

Dans cette technologie, la phase stationnaire est un liquide qui imprègne un solide en principe inerte, ou qui est greffé par liaison chimique covalente sur ce support. La séparation des solutés est fondée sur leur différence de solubilité (leur partage) entre cette phase stationnaire et la phase mobile liquide. Le coefficient de distribution est appelé coefficient de partage.

Cette technique s'apparente à l'extraction liquide-liquide, basée sur les différences de solubilité entre deux phases non miscibles. Mais ici, l'une des phases est immobilisée sur un solide dont les particules ont de très petits diamètres. L'augmentation considérable de la surface de contact entre les deux phases fait que l'on obtient des efficacités très supérieures à celles obtenues en extraction liquide-liquide classique, à contre courant.

Comme en extraction, il faut que la solubilité de l'une des deux phases dans l'autre soit aussi faible que possible.

Dans la chromatographie de partage classique, on choisit une phase stationnaire fortement polaire (silice, par exemple) et une phase mobile apolaire (hexane, éther, chloroforme).

Ainsi, dans le cas classique de la chromatographie d'interactions hydrophobes, les constituants sont séparés sur la base de leurs différences d'hydrophobicité de surface grâce à un support non chargé et possédant des groupes hydrophobes aliphatiques (colonnes de type octyl-Sepharose), ou aromatiques (phényl-Sepharose). Ce type de séparation est applicable à la plupart

des protéines car celles-ci renferment toujours des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe suffisamment exposés pour permettre des interactions avec un support hydrophobe. Cette chromatographie utilise une colonne remplie d'un gel et équilibrée dans des conditions qui favorisent les interactions hydrophobes, par exemple une force ionique élevée. Après dépôt de l'échantillon, l'élution est généralement réalisée en appliquant un gradient descendant de concentration saline qui permet de désorber les protéines dans un ordre croissant d'hydrophobicité de surface.

Au contraire, dans la chromatographie de partage à polarité de phases inversées (la plus fréquemment utilisée en CLHP, sous le nom de CLHP en phase inverse, ou en phase "réverse" : RP-CLHP), la phase stationnaire est de nature apolaire (chaînes aliphatiques) et la phase mobile est constituée par un liquide polaire (eau, méthanol).

De nombreuses colonnes ont été utilisées. Initialement, on a développé des colonnes de 25 cm, avec une phase stationnaire greffée en C₁₈, constituée de particules de 5 ou 10 µm et comportant des pores de 300Å. Ultérieurement, la tendance a été d'utiliser des chaînes aliphatiques plus courtes : C₈, C₄, ou C₃, des particules plus grosses et des colonnes plus courtes qui autorisent des débits plus élevés, des pentes de gradients plus fortes, sans perte de résolution. Des températures plus élevées (obtenues grâce à des fours à colonnes réglés à 50, 60, et même 70° C) améliorent aussi très sensiblement la résolution.

Les conditions les plus classiques actuellement utilisées avec les protéines des céréales font appel à une phase mobile composée d'acétonitrile 20 % (ACN) contenant 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA). L'ACN a l'avantage de posséder une faible viscosité et d'être transparent aux ultra-violets, permettant une détection à 210 nm. Le TFA est un acide organique hydrophobe qui accroît l'hydrophobicité des protéines et améliore leur discrimination grâce à un accroissement des temps de rétention. Il contribue à la solubilisation des protéines et à l'amélioration du rendement des colonnes. Sa concentration optimale est cependant difficile à déterminer car, en léger excès, s'il peut améliorer la solubilité et la résolution des courbes, il peut entraîner une déformation de la ligne de base, ainsi qu'une désamidation des protéines. Dans ce système, l'élution des différentes protéines est généralement assurée par un simple gradient linéaire d'ACN, de 20 à 55 %, le tout réalisé en 55 minutes à 50 ou 60° C.

3) La chromatographie d'exclusion-diffusion

La chromatographie d'exclusion-diffusion est fondée sur la rétention des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration ou non dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si l'on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulière, les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les pores : elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer statistiquement dans un plus grand nombre de pores. Les grosses molécules sont éluées par un volume V_0 qui correspond au volume entre les "grains" de la phase stationnaire, ou "volume mort" de la colonne. Les très petites molécules pénètrent dans le réseau du gel et sont éluées par un volume V_t égal au volume total de solvant contenu dans la colonne. La séparation est donc fondée ici, non sur des interactions physicochimiques avec la phase stationnaire, mais sur la dimension des molécules en solution. Entre les deux cas limites, celui où les molécules sont totalement exclues, et celui où tous les pores de la phase stationnaire sont accessibles aux molécules considérées, le volume de rétention d'une molécule varie linéairement en fonction du volume poreux accessible. Ainsi, à chaque valeur de ce volume de rétention correspond

théoriquement une taille de molécule. D'où l'utilisation de la technique pour la détermination des masses moléculaires.

Plusieurs types de gels peuvent être utilisés. On distingue les gels mous, semi-rigides et rigides. Seuls ces derniers sont utilisables avec des vitesses de phase mobile élevée (FPLC, par exemple).

Les gels mous sont constitués de polymères à faible taux de pontage, pour lesquels le gonflement est important. Il s'agit le plus souvent de dextrane (gels de type Sephadex : G 25, G 50, G 75, G 100, G 200), parfois de polyacrylamide (Biogels : P 6, P 30, P 60, etc.), ou de gels mixtes polyacrylamide-dextrane.

Les gels semi-rigides sont constitués de polystyrène ou d'acétate de polyvinyle.

Les gels rigides sont constitués par des silices poreuses (exemple : les gels TSK) ou des verres poreux. Résistant aux hautes pressions, ces gels sont utilisables en CLHP.

A la condition de travailler avec une force ionique suffisante, les problèmes d'adsorption irréversible sont limités avec ces types de supports. Les rendements de récupération sont généralement très élevés, beaucoup plus qu'avec la chromatographie d'échanges d'ions. Le pH de la phase mobile reste cependant souvent un paramètre critique : les colonnes CLHP de type TSK SW doivent être impérativement maintenues à des pH inférieurs à 7.0 (fonte du support silice au delà de pH 7,5 avec destruction immédiate de la colonne). En revanche, les colonnes TSK PW supportent une gamme étendue de pH, mais elles ne sont pas nécessairement adaptées au fractionnement des protéines.

1.2 - La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) : en quoi se distingue-t-elle de la chromatographie liquide classique ?

La CLHP se distingue de la chromatographie classique par :

- le remplissage des colonnes qui est fait avec un matériau composé de particules très fines (3 à 10 μm) ;
- les colonnes sont de petite taille, réutilisables, d'environ 2 à 20 mm de diamètre et de 10 à 30 cm de longueur ;
- la pression d'entrée est élevée et le contrôle du débit de la phase mobile est très strict ;
- les dispositifs d'introduction de l'échantillon, très précis, ne nécessitent que de faibles quantités ;
- les détecteurs fonctionnent en continu et permettent la détection de quantités très petites ;
- les appareils sont automatisés ;
- les analyses sont rapides : quelques dizaines de minutes ou même quelques minutes ;
- la résolution est beaucoup plus élevée ;

- la transposition analytique / préparative est aisée : les analyses effectuées en chromatographie classique sont, la plupart du temps, réalisables en CLHP et, avec cette dernière, les purifications obtenues sont très supérieures et le temps d'exécution beaucoup plus court.

1.3 - Description des systèmes de chromatographie liquide à haute performance

1.3.1 - La colonne : le coeur du procédé

La séparation proprement dite est liée essentiellement à la nature et aux caractéristiques de la colonne. Sans entrer dans le détail théorique, rappelons que le pouvoir de résolution d'une colonne dépend de trois facteurs : l'efficacité, exprimée en nombre de plateaux théoriques par mètre, reflète la finesse des pics des composés sortant de la colonne ; la sélectivité indique l'aptitude du système à les séparer, tandis que le facteur de capacité définit les temps de rétention des composants du mélange.

1) Types de phases stationnaires

Il existe aujourd'hui des centaines de phases stationnaires distribuées par des dizaines de fabricants. Notons parmi elles, l'importance toute particulière prise par les phases de silice greffée par des groupes X-Si-C_n. X est un chlorure par exemple qui effectue le greffage par réaction avec les silanols libres de la silice avec formation d'une liaison siloxane. Lorsque C_n est un groupe apolaire - hydrocarbure comptant de 1 à 18 atomes de carbone, ou terminé par un groupement benzénique - la silice ainsi modifiée permet d'effectuer des chromatographies en phase inverse où l'élution se fait par des solvants polaires - eau, méthanol, acétonitrile principalement. Cette méthode a trouvé de nombreuses applications dans le domaine des molécules d'intérêt biologique.

Si la plupart des phases stationnaires maintenant classiques sont préparées à partir de silice, certaines utilisent des supports polymériques - résines de Toyo Soda, résines pour FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Pharmacia, résines pelliculaires de Dionex par exemple. Cette innovation trouve son application dans le domaine des chromatographies d'échange d'ions et d'exclusion : elles peuvent travailler dans une gamme plus large de pH et, pour certaines d'entre elles, être nettoyées à la soude diluée, assurant ainsi à l'utilisateur l'élimination totale de résidus entre deux séparations.

Le greffage sur silice autorise la fixation de toutes sortes de molécules permettant la séparation de produits aux propriétés extrêmement voisines : colonnes chirales, grâce auxquelles on obtient la séparation de mélanges racémiques, ou de cyclodextrines. Ce sont ici les secteurs de la chimie fine et de la pharmacie qui sont les plus directement concernés.

2) Diamètre des particules, longueur et diamètre de la colonne

D'autres paramètres que la phase stationnaire interviennent également dans l'optimisation du choix de la colonne : diamètre des particules, longueur et diamètre intérieur de la colonne. La colonne est d'autant plus efficace que le diamètre des particules est plus faible et qu'elle est plus longue. Mais l'allongement augmente les volumes de solvant et les temps d'analyse, tandis que la diminution de taille des particules entraîne une perte de charge importante. Pour fixer un ordre de grandeur, on peut utiliser des colonnes d'environ 25 cm de

long pour des particules de 5 à 10 μm , ou de 10 à 15 cm de long pour des particules de 3 μm .

Le diamètre intérieur est choisi en fonction des quantités de produit injectées. En CLHP analytique, le diamètre le plus courant se situe autour de 4 mm. Il est beaucoup plus délicat d'utiliser des colonnes de 1 mm : des particules pas trop fines doivent alors être utilisées pour réduire les risques de colmatage et de pressions trop élevées.

Si la CLHP est une méthode puissante, elle est aussi onéreuse en consommables : quantités importantes de solvants d'un haut degré de pureté, colonnes dont la durée de vie est limitée. Les fabricants s'emploient à y remédier : mise au point de colonnes plus courtes, amélioration de leur longévité, diminution de prix des colonnes neuves, services qui proposent le reconditionnement des colonnes (changement de la phase stationnaire).

1.3.2 - L'instrumentation

Si l'utilisateur a - on vient de le voir - un large choix de méthodes de séparation et de types de colonnes, ce choix n'est pas moindre dans le domaine de l'appareillage.

Aujourd'hui, le constructeur doit répondre à deux demandes spécifiques des chromatographistes, demandes qui impliquent deux démarches totalement différentes. D'une part, les milieux biochimique et biologique souhaitent pouvoir analyser des quantités de plus en plus faibles de produits ; d'autre part, les industriels de la chimie fine et de la pharmacie considèrent, depuis quelques années que la CLHP peut être une méthode économiquement justifiable de séparation et de purification de molécules à haute valeur ajoutée. Cela suppose une conception tout à fait particulière du matériel adaptée à ces problèmes. Le tableau 1 résume les caractéristiques d'un certain nombre de systèmes disponibles sur le marché dans le secteur de l'analyse et de la préparation à l'échelle du laboratoire. Devant la floraison d'appareils, seul l'utilisateur est à même de déterminer le meilleur rapport qualité/prix en fonction de ses besoins propres.

Le trait commun à l'ensemble de ces systèmes est d'être modulaire. On compose sa CLHP un peu comme on le ferait pour une chaîne haute fidélité, soit en choisissant les divers éléments dans la gamme d'un constructeur selon l'application spécifique, soit en associant des éléments provenant de constructeurs différents et en la complétant en fonction du développement des nécessités... ou des impératifs budgétaires.

Tentons maintenant de mettre en lumière quelques développements récents qui permettent de repousser les limites de sensibilité de la méthode ou bien de résoudre des problèmes particuliers, notamment en biologie.

1) Les pompes

Débit, pression, mode d'élution - isocratique ou gradient - sont conditionnés par les systèmes de pompe. Les objectifs actuels sont d'étendre la gamme des débits, notamment vers les faibles valeurs, tout en maintenant le flux le plus constant possible et en minimisant les volumes morts : l'emploi de colonnes de faibles diamètres impose des exigences particulières à ce niveau. Modulaires parmi les modulaires, quelques sociétés - Gilson, Jasco, Kontron par exemple - dissocient les têtes et le corps de pompe. Avec six têtes de pompe différentes Gilson peut couvrir une gamme de débits allant de 0.5 μl par minute à 100 ml par minute. Pour

résoudre les problèmes de biocompatibilité des matériaux au contact des produits et des solvants, certains constructeurs proposent des pompes en titane, en céramique, ou en matériau synthétique. Bon nombre de spécialistes pensent cependant qu'à moins d'utiliser des milieux très corrosifs, le risque de relargage d'impuretés métalliques apr l'acier inox est négligeable.

Pompes mono ou multiples pistons, les deux systèmes coexistent, mais les premières nécessitent généralement l'addition d'un amortisseur de pulsations. Le choix et le nombre des pompes est lié au mode de gradient. Pour un gradient haute pression, une pompe par solvant et une chambre de mélange en aval sont exigées. Pour un gradient basse pression on doit interposer des vannes proportionnelles entre les flacons de solvant et la pompe. L'utilisation de gradient requiert aussi l'acquisition d'un module de programmation piloté par microprocesseur.

2) Les détecteurs

Point crucial de la CLHP - certains disent son point faible -: la détection des composés à la sortie de la colonne. Perfectionnement des systèmes existants, mise au point de nouveaux modes de détection: les recherches se poursuivent parallèlement dans ces deux voies.

a) Spectrophotométrie UV et visible

Bien qu'elle ne soit pas générale car elle ne détecte que les molécules qui possèdent un chromophore, la spectrophotométrie ultra-violette et visible est sans doute le moyen de détection le plus classique en CLHP. On dispose aujourd'hui de spectrophotomètres programmables qui offrent des possibilités de mesure à plusieurs longueurs d'ondes et à différentes échelles d'absorption pour un même chromatogramme. Ils donnent également le rapport d'absorption entre deux longueurs d'onde - information sur la pureté du produit - et permettent parfois l'enregistrement instantané des spectres - confirmation du choix de la longueur d'onde optimale.

Le *nec plus ultra* dans le domaine, c'est le spectrophotomètre à barrettes de diode: il donne une lecture simultanée des intensités lumineuses à toutes les longueurs d'onde comprises entre 20 et 600 nm. On dispose ainsi d'une information double - absorption en fonction du temps et de la longueur d'onde - ce qui permet d'obtenir des chromatogrammes tridimensionnels et d'optimiser très rapidement les conditions chromatographiques.

Possibilités de programmation, mais avant tout qualité optique, distinguent entre eux les divers spectrophotomètres: rapport signal/bruit aux plus faibles échelles d'absorption (qui peuvent aller jusqu'à 0.001 de densité optique), dérive de la ligne de base, temps de réponse. Les meilleurs d'entre eux sont capables de détecter l'ordre de grandeur de la picomole (10^{-12} mole).

b) Fluorométrie

Bien que méthode reine de la sensibilité (jusqu'à 30 femtomoles: 10^{-15} mole), la fluorométrie est cependant d'un emploi moins généralisé. On rappelle qu'en fluorescence, la solution est excitée à une longueur d'onde qui est en général celle de son maximum d'absorption. Une partie de l'énergie acquise par l'absorption de photons va alors se dissiper sous forme non radiative durant le temps de vie de l'état excité. L'énergie d'émission sera donc plus faible, ce qui explique que la longueur d'onde d'émission sera toujours plus grande que celle de

l'excitation. Si la fluorimétrie est une technique plus sensible que la spectrophotométrie, la quantification des signaux exige cependant plus de précautions car l'intensité de fluorescence n'obéit pas à la loi de Beer.

L'inconvénient majeur de la méthode est cependant lié au nombre relativement faible de molécules qui fluorescent naturellement. Cela a donc amené à mettre au point des systèmes de dérivation : réaction entre le composé à détecter et une substance chimique qui lui confère les propriétés optiques dont il est dépourvu. La méthode est applicable aussi bien à la détection en UV/visible qu'à la fluorimétrie.

c) Systèmes de dérivation

Le principe de dérivation post-colonne a davantage la faveur des constructeurs que le pré-colonne, mais il présente de nombreuses contraintes liées au temps de réaction, à la reproductibilité de la conversion, à la compatibilité du réactif et de la réaction avec la phase mobile.

La dérivation post-colonne est particulièrement utilisée pour la **détection des acides aminés**. Ninhydrine, fluorescamine, chlorure de dansyle et surtout phénylisothiocyanate (qui fournit les dérivés phénylthiohydantoïne) sont parmi les réactifs les plus courants pour obtenir des composés qui fluorescent ou qui absorbent.

Autre famille de composés d'importance biologique pour laquelle la détection pose problème : celle des sucres. Jusqu'à une époque récente, la dérivation post-colonne ne permettait que de détecter les sucres réducteurs. Un nouveau système permet de détecter tous les sucres, réducteurs ou non. Il consiste à faire passer les composés dans un réacteur en phase solide qui catalyse l'hydrolyse des sucres non réducteurs en espèces réductrices. Celles-ci réagissent ensuite avec le 4-aminobenzoylhydrazide et l'on détecte le produit formé à 405 nm avec une sensibilité d'environ 30 ng.

d) De l'indice de réfraction à l'électrochimie

La technique la plus classique de détection de sucres non dérivés est celle de l'indice de réfraction. Ces détecteurs qui ont le mérite de l'universalité présentent pourtant de nombreux inconvénients : manque de sensibilité, de sélectivité, de stabilité à la température,, impossibilité de travailler en gradient.

Autre méthode permettant la détection de sucres possédant des groupements hydroxyles anomères libres : l'électrochimie. Les sucres peuvent être ainsi élués sous forme ionique dans des éluons de soude sur une colonne échangeuse d'ions supportant des pH supérieurs à 13. Ils sont ensuite détectés par ampérométrie impulsionnelle. La méthode permet de détecter des concentrations en sucres de 100 µg par litre.

La détection électrochimique s'adresse aussi à toute autre substance chargée (la technique est alors la conductimétrie), ou composé susceptible d'être oxydé ou réduit (ampérométrie ou coulométrie). Ces méthodes sont utilisées pour l'analyse des catécholamines, des phénols, des vitamines, ou des pesticides.

e) Perspectives.

Les perspectives touchent à l'amélioration de la sensibilité, aux progrès dans le traitement des données pour des modes de détections classiques, mais aussi à la mise au point de nouvelles méthodes. Si, pour ces derniers, l'utilisation de l'infrarouge à transformée de Fourier ou de la spectrométrie de masse est encore pour l'essentiel du domaine de la recherche, de nouveaux détecteurs spécifiques sont déjà commercialisés. Signalons notamment les détecteurs de radioactivité (rayonnements β durs et γ mous, ainsi que ^{14}C).

Le laser, utilisé comme source lumineuse puissante et monochromatique, en absorption, en fluorescence ou en photoionisation, peut abaisser sensiblement les limites de sensibilité des méthodes spectrophotométriques.

3) L'injection

Si les qualités de la CLHP sont vite apparues, son inconvénient en utilisation de routine est de mobiliser les personnes pour une tâche fastidieuse (injection au moyen de seringues, un échantillon après l'autre). Aussi a-t-il été nécessaire de mettre au point des systèmes d'injection automatique, pilotés par microprocesseur, qui permettent, grâce à des boucles d'injection (de quelques μl en CLHP analytique à quelques ml en préparative), de faire fonctionner les appareils 24 heures sur 24 et d'améliorer considérablement la répétabilité des résultats.

Les échantillons injectés automatiquement ont parfois besoin d'être prépurifiés. Dans certains cas, cela peut se résoudre par l'addition de précolonnes. Dans d'autres cas, cela peut nécessiter des opérations plus compliquées : emploi de cartouches de silices à phase greffée qui permettent de retenir les impuretés, ces cartouches étant ensuite transférées dans le système CLHP où elles deviennent l'équivalent de boucles d'injection.

4) Applications à des biomolécules spécifiques

Certains constructeurs ont adopté une approche consistant à mettre au point un matériel ou une technique spécifiquement adapté aux demandes des biochimistes et des biologistes. Applied Biosystems a ainsi développé des CLHP adaptées aux problèmes de purification des peptides, protéines et oligonucléotides (avant séquençage), ainsi que d'analyse des composés issus du séquenceur. La limite d'analyse peut atteindre 0.1 picomole.

Autre technique développée par Pharmacia : la FPLC. Bien qu'applicable aussi à l'analyse de microquantités, la méthode a avant tout une vocation préparative : l'augmentation d'échelle est un des objectifs actuels de la société. Le système deux pompes à deux seringues de verre fonctionnant en opposition (limite de pression 40 bars); Les colonnes contiennent des phases constituées de particules macroporeuses et de diamètres très uniformes- sur supports polymères en échanges d'ions et perméation en gel, sur silice en phase inverse. Ces colonnes peuvent supporter des charges importantes. L'ensemble de la chaîne est biocompatible.

II - APPLICATION AUX BLES ET AUX FARINES

2.1 - Caractérisation des protéines

2.1.1 - Généralités sur les protéines des blés

De toutes les protéines végétales, celles du blé sont certainement les plus importantes aux plans nutritionnel (140 000 tonnes de ces protéines sont consommées chaque jour dans le monde) et fonctionnel (en raison de leur propriété unique de se rassembler sous la forme d'un gluten, propriété qui détermine le caractère panifiable ou pastifiable des blés). Les protéines du blé et des autres céréales sont cependant plus difficiles à étudier que celles des autres protéines végétales ou animales. La majeure partie des protéines du grain de blé sont en effet des protéines de réserve, insolubles dans l'eau ou les solutions salines, et seulement extractibles par des alcools dilués (gliadines), ou par des acides, bases, détergents, agents dissociants ou réducteurs (gluténines). La composition en acides aminés inhabituelle de ces protéines (richesse considérable en glutamine, proline et glycine), associée à une forte tendance à former des agrégats de taille très élevée par des interactions non covalentes, ou par des liaisons disulfures, explique leurs propriétés de solubilité particulières et rend inutilisables de nombreuses méthodes analytiques. Les protéines du blé sont également très hétérogènes en raison de : 1) la polyploïdie des blés, 2) l'existence de nombreux polypeptides homologues à la suite de duplications de gènes et de mutations intervenues chez les ancêtres des blés ainsi qu'au cours de leur phylogenèse, 3) l'existence de modifications post-traductionnelles. A titre d'exemple, la gliadine et la gluténine sont constituées chacune d'au moins 100 polypeptides. Une telle hétérogénéité, associée à de nombreuses homologies structurales, placent les protéines du blé parmi les protéines végétales les plus complexes à isoler et caractériser.

2.1.2 - Intérêt de fractionner les protéines du blé par CLHP

Les protéines déterminent les qualités technologique et nutritionnelle des blés et des farines. Leur étude revêt donc une importance considérable, que ce soit pour la sélection des variétés, le commerce ou l'utilisation industrielle. La possibilité de fabriquer des colonnes de CLHP capables de séparer des protéines de taille élevée, telles que les protéines de réserve du blé, est à l'origine du développement d'un tout nouvel outil performant pour le chimiste céréalier, pouvant surpasser la plupart des techniques classiques de purification et de caractérisation des protéines du blé.

2.1.3 - Caractérisation des protéines du blé

La CLHP en phase inversée (RP-CLHP) est devenue l'une des plus puissantes méthodes de caractérisation des protéines du blé. Dès le début, avec les travaux de BIETZ (1983, 1984), la résolution obtenue s'est avérée égale ou supérieure à celle des autres techniques existantes. Par la suite, la technique a été encore affinée pour l'étude particulière des gliadines ou des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (BURNOUF et BIETZ, 1984). Ainsi, la séparation d'une gliadine de blé sur une colonne C₁₈ à 60° C ne donne pas moins de 50 pics, dépassant ainsi la résolution habituelle des électrophorèses. Encore que plusieurs de ces pics ne soient pas électrophorétiquement purs car renfermant plusieurs composants de charge ou de taille différente (électrophorèse et RP-CLHP restent donc des outils complémentaires). POPINEAU et PINEAU (1985) ont également

examiné l'hydrophobicité de surface de gliadines purifiées par RP-CLHP, et ont comparé les résultats à ceux de la chromatographie classique d'interactions hydrophobes. Les deux méthodes ont conduit aux mêmes interprétations, mais la RP-CLHP s'est avérée nettement plus résolutive.

2.1.4 - Identification des variétés et des espèces

Une application particulièrement significative de la CLHP est l'identification des génotypes de blé et autres céréales. Bien que certains travaux aient utilisé des chromatographies d'échange d'ions (BATEY *et al.*, 1989) ou d'exclusion-diffusion (BIETZ, 1984), la plupart des travaux se sont fondés sur la RP-CLHP.

La RP-CLHP, tout comme une électrophorèse, est en mesure de différencier et d'identifier les variétés à partir de "l'empreinte digitale" que constitue le diagramme de la fraction gliadine (BIETZ, 1983), lequel est exprimé de façon quasi constante pour un génotype donné, quels que soient les facteurs agro-climatiques. Les conditions d'extraction des gliadines ont été optimisées (BIETZ *et al.*, 1984), rendant la CLHP applicable à tous les types de blés (KRUGER et MARCHYLO, 1985 ; BIETZ *et al.*, 1984). Il a été confirmé que les diagrammes de RP-CLHP étaient bien indépendants du lieu de culture (KRUGER et MARCHYLO, 1985), du moins qualitativement, car de légères variations qualitatives ont été décelées dans le cas de blés cultivés sur des sols déficients en soufre (LOOKHART et POMERANZ, 1985).

Comme les diagrammes de RP-CLHP sont parfaitement reproductibles et caractéristiques des génotypes, ils peuvent constituer un moyen de marquage sûr lors de l'inscription des nouvelles variétés sur les catalogues officiels. Selon BIETZ et COBB (1985), une identification est même possible en moins de 10 minutes si l'on utilise un gradient plus court, un débit plus élevé, et en travaillant à 60° C.

L'identification des génotypes est également envisageable à des fins de sélection ou de criblage de semences en vue d'en déterminer la pureté variétale ou la pureté hybride. La RP-CLHP a pu ainsi révéler que de nombreuses variétés consistaient en fait en plusieurs "biotypes" de diagramme différent et donc génétiquement différents (BIETZ et COBB, 1985 ; BIETZ, 1984 ; LOOKHART *et al.*, 1986).

Cette pureté variétale a pu être déterminée, soit à partir de l'analyse d'un grand nombre de grains, soit, dans certains cas, à partir d'un mélange de grains broyés. Dans ce dernier cas, les divers composants du mélange et la composition quantitative ont pu être reconstitués par traitement informatique de la courbe du mélange (BIETZ, 1986).

BURNOUF et BIETZ (52) ont également démontré que des souches de *Triticum* et d'*Aegilops* diploïdes et tétraploïdes possédaient des compositions différentes et que la RP-CLHP constituait un moyen pour sélectionner des génotypes atypiques et potentiellement intéressants.

Dans un autre domaine, on doit également signaler le potentiel de la RP-CLHP pour distinguer le blé dur et le blé tendre à partir de l'analyse des gliadines. Comme en outre certaines gliadines (fraction ω -gliadine) sont à la fois extrêmement thermostables et spécifiques du génome D des blés tendres, il est possible d'envisager la détection et peut-être le dosage précis du pourcentage de farine de blé tendre ajouté dans les pâtes alimentaires ayant subi des traitements thermiques à haute température (McCARTHY *et al.*, 1989).

2.1.5 - Etudes génétiques

Les premières analyses de gliadines (BIETZ *et al.*, 1984 ; BURNOUF *et al.*, 1983) et de gluténines (38) ont montré que la CLHP permettait de déterminer la localisation chromosomique des gènes correspondants. Ceci est donc fondamental pour la sélection lorsqu'on a affaire à des protéines qui déterminent directement les propriétés fonctionnelles du gluten et de la pâte (BIETZ et BURNOUF, 1985 ; BURNOUF et BIETZ, 1985). La comparaison des différentes sous-unités de la gluténine à partir de lignées aneuploïdes a par exemple montré que les sous-unités de haut poids moléculaires avaient des hydrophobicités de surface moins élevées que les sous-unités de faible poids moléculaire (LMW). La composition particulière en sous-unités HMW a été trouvée associée à la qualité boulangère des blés, de sorte que sa détermination par CLHP permet une prédiction de la qualité. L'hydrophobicité de surface ayant été trouvée associée à la force boulangère, il devient même possible d'attribuer un score à une sous-unité nouvellement découverte (BIETZ et BURNOUF, 1985 ; BURNOUF et BIETZ, 1985).

2.1.6 - CLHP préparative

La CLHP a montré un potentiel considérable en matière de purification préparative des protéines à partir du moment où il a été possible de séparer un mélange de 5 mg de protéines de blé avec une bonne résolution. BURNOUF et BIETZ (1984) ont ainsi réussi à isoler des constituants gliadines purs par RP-CLHP, en quantités suffisantes pour en permettre la caractérisation plus fine. De telles fractions se sont avérées quasiment homogènes à la fois en RP-CLHP analytique et en électrophorèse. Il a été également possible de purifier par CLHP les principales sous-unités HMW-gluténines associées à la qualité boulangère (BURNOUF et BIETZ, 1985). HUEBNER et BIETZ (1984) ont cependant montré que, dans le cas d'extraits protéiques complexes, il était préférable d'opérer une purification préalable par SE-CLHP (CLHP d'exclusion), ou d'échanges d'ions, car aucune de ces techniques prise indépendamment ne permet réellement l'obtention de polypeptides purs.

2.1.7 - Prédiction de la qualité

La CLHP possède un potentiel considérable pour déterminer, ou pour suivre, la qualité des grains et des farines. A la fois la SE-CLHP et la RP-CLHP ont été utilisées pour la prédiction de la qualité boulangère des blés tendres ou la qualité pastière des blés durs.

La distribution des tailles moléculaires des protéines natives, associées à la qualité boulangère ou aux propriétés rhéologiques de la pâte, avait été déterminée par HUEBNER et WALL (1976) par chromatographie d'exclusion classique. BIETZ (1984) a alors déterminé les poids moléculaires des protéines non réduites par SE-CLHP et a pu confirmer par cette méthode beaucoup plus rapide et plus sensible la corrélation de cette distribution de poids moléculaire avec la qualité boulangère. Une nouvelle confirmation a été apportée par HUEBNER et BIETZ (1985), mais la technique de SE-CLHP ne connut pas de développement important aux U.S.A. en raison de problèmes d'extractibilité des protéines de la farine, et de stabilité des extraits protéiques. Les seules applications ont été en effet la prédiction de la qualité boulangère à partir du rapport entre sous-unités HMW et sous-unités LMW réduites, ainsi que la détection des blés germés à partir du changement du profil des tailles moléculaires des protéines.

En France, par contre, plusieurs études ont été consacrées à la SE-CLHP

dans le but de prédire la qualité boulangère des blés tendres au niveau de la sélection (DACHKEVITCH, 1989 ; DACHKEVITCH et AUTRAN, 1989), la qualité des farines dans l'industrie (MERITAN, 1990), ainsi que la qualité des glutens (MERITAN, 1990 ; GODON, 1991). Le problème de la stabilité des extraits, qui avait limité le développement de la SE-CLHP, a été notamment résolu grâce à l'extraction des protéines à température élevée (inhibition des protéases ?) de sorte que des courbes extrêmement reproductibles ont pu être obtenues en 30 minutes seulement par échantillon. Un extrait de protéines non réduites comporte ainsi 4 pics en SE-CLHP. Une prédiction de la force boulangère a été possible en prenant en compte la proportion de pic 1 (agrégats protéiques de taille $> 10^6$), ou encore le rapport : pic 1/pic 2. La proportion de pic 2 (agrégats de taille moléculaire moyenne, riches en LMW-gluténines) a été trouvée davantage corrélée à l'extensibilité de la pâte et au volume du pain en panification française. En raison de ses performances intéressantes (rapidité, automatisation, interprétation informatisée des courbes, travail sur des micro quantités, etc.), l'outil SE-CLHP apparaît donc adapté pour un usage en routine dans les programmes de sélection. Le coût des colonnes et la relative sophistication de l'équipement ont cependant, pour l'instant, limité son développement.

Du point de vue des équipes d'Amérique du nord, la RP-CLHP est mieux adaptée que la SE-CLHP à la prédiction de la qualité. La RP-CLHP permet en effet une identification des génotypes, donc d'un potentiel de qualité. Elle permet aussi de détecter des protéines qui sont des marqueurs spécifiques de la qualité. BIETZ *et al* (1984) ont ainsi retrouvé en RP-CLHP les pics des protéines corrélées à la qualité pastière des blés durs. Ces pics correspondaient en effet aux γ -gliadines dites "42" et "45" en électrophorèse. Une version rapide de cette RP-CLHP permet en outre la prédiction du type γ -gliadine en moins de 10 minutes.

De même, la présence ou l'absence de sous-unités HMW-gluténines par RP-CLHP permet, comme par électrophorèse, une prédiction de la force boulangère des blés tendres (PAYNE *et al.*, 1984 ; BURNOUF et BIETZ, 1984 ; BURNOUF et BIETZ, 1985). La quantification obtenue par RP-CLHP est cependant apparue plus fiable que celle obtenue par densitométrie des diagrammes électrophorétiques et a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'effet de ces protéines sur la qualité est avant tout d'ordre quantitatif. Le simple rapport HMW/LMW constitue d'ailleurs un indice de qualité boulangère. Enfin, d'autres fractions, telles que des gliadines très hydrophobes, ont également pu être identifiées comme étant des facteurs de la qualité boulangère (HUEBNER et BIETZ, 1986). Ces fractions n'ont cependant pas été identifiées clairement et on ne peut pas exclure qu'il s'agisse de LMW-gluténines qui contaminent toujours plus ou moins les extraits des farines par l'éthanol.

2.1.8 - Etude des interactions protéiques au cours des processus technologiques

La CLHP possède également un potentiel important pour la révéler les interactions entre protéines, ou entre protéines et autres constituants. Il a en effet été observé une amélioration de la séparation des gliadines lorsque la RP-CLHP est réalisée à des températures élevées, indiquant un rôle possible des liaisons hydrogènes dans l'agrégation des gliadines. Des conditions non optimales de séchage ou de stockage peuvent ainsi être décelées en analysant les profils des courbes de RP-CLHP (MEIER *et al.*, 1985). La méthode de CLHP pourrait donc être utilisée en vue d'optimiser les conditions de séchage et de conservation des grains et des farines et donc de contribuer à une amélioration de la qualité.

Chez le blé dur, la CLHP a permis de préciser le rôle des LMW-gluténines dans la qualité culinaire des pâtes, en raison de leurs propriétés agrégatives, notamment sous l'effet des traitements thermiques, et en association avec d'autres

fraction de faible poids moléculaire riches en soufre (AIT-MOUH, 1989 ; AUTRAN *et al.*, 1989 ; FEILLET *et al.*, 1989).

La RP-CLHP a été également utilisée pour caractériser les protéines qui réagissent avec les lipides (ZAWISTOWSKA *et al.*, 1986) et révéler des changements conformationnels résultant du clivage de liaisons disulfures ou de l'alkylation de résidus cystéines (BIETZ, 1986 ; BURNOUF et BIETZ, 1984). Dans l'avenir, l'approche des interactions protéiques et des changements conformationnels pourrait donc devenir une importante application pour la CLHP.

2.2 - Caractérisation des autres constituants

La plupart des autres constituants, majeurs ou mineurs, des blés et des farines ont fait l'objet d'études mettant à profit l'outil CLHP, soit à des fins de recherche approfondie de la composition ou des propriétés fonctionnelles, soit à des fins de contrôle en routine de la qualité des matières premières ou des produits finis.

Quelques exemples récents en sont donnés ci-dessous :

2.2.1 - Amidon

Le dosage de l'amidon a toujours posé des problèmes aux chimistes céréaliers car sa nature chimique oblige à le doser de manière indirecte : polarimétrie, dosage enzymatique après saccharification complète, etc.

La CLHP a été utilisée avec succès depuis 1977 pour le dosage des sucres simples, mono- et disaccharides) dans les aliments au moyen de colonnes contenant une phase polaire (Hypersil-APS) avec élution par de l'acétonitrile à 82 % et avec un détecteur réfractométrique. Le procédé a donc été étendu au dosage de l'amidon sous la forme de glucose après hydrolyse acide (BOLEY et BURN, 1990). Le procédé s'est avéré rapide (10 minutes) et reproductible à partir d'aliments de composition variée. Il fait actuellement l'objet de circuits d'analyse au sein de la CEE.

2.2.2 - Lipides

L'analyse des lipides complexes des céréales présente des problèmes particuliers en raison de la présence de quantités importantes de glycolipides en plus des phospholipides normalement rencontrés dans les tissus végétaux et animaux. D'ailleurs, assez peu d'applications de la CLHP ont été décrites pour analyser les lipides végétaux. Des gradients d'hexane-isopropanol-eau, ou une élution isocratique par l'acétonitrile-méthanol-H₂SO₄ ont été cependant utilisés comme phase mobile avec des colonnes de gel de silice et une détection UV à 205 nm pour séparer les différentes classes lipidiques. Mais, avec une détection UV, la quantification des lipides reste rarement possible car de simples traces de lipides oxydés donnent des signaux intenses qui dominent le signal des lipides naturels. Récemment, cependant, une nouvelle méthode rapide d'analyse des classes lipidiques a été adaptée au cas des lipides de la farine par CHRISTIE et MORRISON (1988). Les six principales classes de lipides polaires ont pu être séparées en 15 minutes, mais l'utilisation d'un gradient ternaire comprenant les mélanges hexane-butane-2-one-acide acétique / hexane-chloroforme-isopropanol-eau, demeure indispensable. D'autres procédés applicables aux lipides de la farine ont été également décrites par HAMMOND (1989) et par WALKER (1988).

2.2.3 - Acides aminés

Le dosage des acides aminés par RP-CLHP, après dérivation, est devenu une méthode classique, beaucoup plus rapide (12 minutes) que les précédentes méthodes de dosage. Une application intéressante a été récemment décrite par PRIETO *et al.* (1989) qui ont pu, grâce à la sensibilité de la méthode de RP-CLHP, suivre les changements dans la composition des acides aminés libres au cours du pétrissage de la pâte, de la fermentation. Une analyse d'extraits de farine et de pâte à différents stades de la panification, sur colonne ODS greffée en C₁₈, avec un gradient linéaire d'acétonitrile, a ainsi permis d'observer l'augmentation générale (+ 64 % en moyenne, davantage marquée pour l'ornithine et la thréonine) de la concentration en acides aminés au cours du pétrissage, suivie d'une chute de 55 % pendant la cuisson, la glutamine, la leucine, l'ornithine, l'arginine la lysine et l'histidine étant les acides aminés les plus réactifs.

2.2.4 - Vitamines

Il existe un besoin croissant de disposer de méthodes analytiques rapides et fiables de dosage des vitamines, ceci en raison du développement de produits enrichis et de l'accent qui est mis sur l'étiquetage précis de la composition en vitamines des aliments.

La CLHP a montré récemment un potentiel élevé pour répondre à ces questions, son avantage principal étant une meilleure sélectivité que les méthodes chimiques ou microbiologiques traditionnelles. Plusieurs articles récents ont fait le point de la question en ce qui concerne l'application de cette méthode aux farines de blé :

- vitamine E : HAAKANSSON B. *et al.* (1987).
- vitamines K : SAKANO et NOTSUMOTO (1988)
- vitamines B₁, et B₂ : REYES et SUBRYAN (1989).
- vitamine B₆ : TSUGE et HIROSE (1989).
- vitamines B₁, B₂ et B₆ : WEHLING et WETZEL (1984)

Les conditions chromatographiques varient naturellement selon le type de vitamine étudié. La CLHP d'échanges d'ions a été parfois retenue pour doser la vitamine B₆. Dans la plupart des cas, cependant, c'est la RP-CLHP, avec colonne greffée en C₁₈ qui a été utilisée. Egalement, pour des raisons de sensibilité, c'est la détection par fluorescence qui a été la plus largement utilisée.

2.2.5 - Acide férulique

On rappelle que le dosage de l'acide férulique (acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique) a été proposé comme méthode permettant de mesurer l'efficacité du procédé de mouture (dont le but est de séparer aussi complètement que possible les sons de l'albumen farineux). Ceci en raison du fait que l'acide férulique a été trouvé (par microscopie de fluorescence) à des concentrations élevées dans les parois des cellules de la couche à aleurone, mais pas dans l'albumen.

Grâce à la RP-CLHP, avec des colonnes greffées en C₆, C₈, ou C₁₈, ce

dosage est maintenant possible en routine dans les différentes fractions de la mouture du blé, avec détection soit par UV, soit par fluorescence. La méthode apparaît nettement plus fiable que par chromatographie en phase gazeuse. Plusieurs publications récentes sont à signaler, notamment : PUSSAYANAWIN et WETZEL (1987) et PUSSAYANAWIN *et al.* (1988).

2.2.6 - Constituants divers

Pour mémoire, on rappelle les récents travaux suivants qui ont développé, pour différents produits céréaliers et notamment la farine de blé, de nouvelles méthodes de dosages mettant en jeu la CLHP :

- Dosage des aflatoxines : TUTELYAN *et al.* (1989).
- Dosage de l'acide phytique : MATSUNAGA *et al.* (1988).
- Détermination des phosphates d'inositol : MATSUNAGA *et al.* (1989) ;
- Dosage de l'azodicarbonamide : OSBORNE (1986)

Conclusions

Bien que la CLHP ait été seulement récemment appliquée aux constituants des blés et des farines, notamment à leurs protéines, elle est maintenant largement adoptée pour résoudre de nombreux problèmes. La CLHP est en effet une méthode extrêmement utile et efficace en raison de ses caractéristiques de : rapidité, sensibilité, pouvoir de résolution, possibilités d'automatisation complète et de quantification informatique des résultats, ainsi que complémentarité avec les autres méthodes. Les méthodes de CLHP sont d'ailleurs toujours en pleine évolution et de nombreuses améliorations sont encore à venir notamment en matière de colonnes. Mais la méthode de CLHP présente également divers inconvénients : les appareillages restent coûteux et sophistiqués ; leur utilisation et leur maintenance nécessitent du personnel hautement qualifié ; le coût d'une analyse reste assez élevé (particulièrement en SE-CLHP) en raison de la pureté élevée requise pour les réactifs, du prix élevé des colonnes et de leur durée de vie limitée (d'autant plus qu'on analyse des produits complexes et des extraits bruts) ; les analyses, bien que rapides, sont séquentielles (à la différence de l'électrophorèse qui permet toujours l'analyse simultanée de 20, 30, ou 40 échantillons. Pour les analyses de protéines, l'électrophorèse demeure donc un concurrent sérieux de la CLHP, notamment pour en routine, sur des produits à faible valeur ajoutée. Cette compétition CLHP/électrophorèse pourrait d'ailleurs rebondir avec le développement croissant de l'électrophorèse capillaire.

Bibliographie

1) Généralités sur la CLHP

- BARFORD R.A. - 1988. High performance liquid chromatography of proteins: status and trends. *Methods Protein Anal.*, 87-108. (J.P. Cherry and Barford R.A., ed.), AOCS: Champaign, Illinois.
- COLWELL L.F. and HARTWICK R.A. - 1987. Non-porous silica supports for high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, 10 (12), 2721-2744.
- CUQ J.L. - 1989. L'évaluation rapide de la teneur en protéines. In: *Méthodes d'analyses rapides en microbiologie et biochimie alimentaire. Session de Formation, Répression des Fraudes*, 17-20 Avril 1990.
- DALLA L.L. - 1990. Modification of the selectivity of a reversed-phase high-performance liquid chromatography system by binding sodium dodecyl sulfate to peptides. *J. Chromatogr.*, 507, 45-49.
- DONG M.W., GANT J.R. and LARSEN B.R. - 1989. Advances in fast reversed-phase chromatography of proteins. *BioChromatography*, 4 (1), 19-27, 30-34.
- FREISER H.H. and GOODING K.M. - 1987. A practical guide for the use of reversed phase chromatography in the analysis of proteins and peptides. *BioChromatography*, 2 (4), 186-189.
- GIORDANO P.C. and BERNINI L.F. - 1988. Advantages of combined fingerprint and HPLC techniques in protein analysis. *Chromatogram*, 9 (2), 8-11.
- GOHEEN S.C. - 1988. High-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins. In: *Methods Protein Anal.*, (Cherry J.P. and Barford R.A., Eds), AOCS, Champagne, Illinois, pp. 165-170.
- GOODING K.M. - 1986. High-performance liquid chromatography of proteins - a current look at the state of the technique. *BioChromatography*, 1 (1), 34-40.
- HASHIMOTO Y., YAMAGATA S. and HAYAKAWA T. - 1987. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography of a single stained protein band from a polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.*, 160 (2), 362-367.
- HEARN M.T.W. - 1987. General strategies in the separation of proteins by high-performance liquid chromatographic methods. *J. Chromatogr.*, 418, 3-26.
- HUANG J.-X. and GUIOCHON G. - 1988. Application of preparative HPLC to peptides and proteins. *BioChromatography*, 3 (4), 140, 143, 144-148.
- HUANG J.X. and GUIOCHON G. - 1989. Applications of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins. *J. Chromatogr.*, 492, 431-469.
- ISSAQ H.J., JANINI G.M., ATAMNA I.Z. and MUSCHNIK G.M. - 1991. Separations by high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis: a comparative study. *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (5), 817-845.
- JOSIC D., HOFMANN W. and REUTTER W. - 1986. Ion-exchange and hydrophobic-interaction high-performance liquid chromatography of proteins. A practical study. *J. Chromatogr.*, 371, 43-54.
- KALGHATGI K. and HORVATH C. - 1987. Rapid analysis of proteins and peptides by reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr.*, 398, 335-339.
- KIM Y.S., SANDS B.W. and BASS J.L. - 1987. Protein loading capacity and textural properties of column packings in reversed-phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr.*, 10 (5), 839-851.

- KONISHI K. -1985. Gel permeation of proteins by HPLC in denaturing solvents. *Progress in HPLC*, Vol. 1, 43-47.
- KONSTANTINIDES F.N., GARR L., LI J.C. and CERRA F.B. - 1987. Overcoming retention time shifts as a source of error in HPLC analysis. *J. Chromatogr. Sci.*, 25 (4), 158-163.
- LOTTSPREICH F. - 1989. HPLC and electrophoresis - competitors or partners. *Chromatographia*, 28 (1-2), 89-91.
- MULLER D., BAUDIN-CHICH V. and WAJCMAN H. - 1986. Use of high-performance liquid chromatography for protein analyses. *Bio-Sciences*, 5 (6), 216-221.
- POTTER R.L. and LEWIS R.V. - 1986. Reversed-phase chromatography of proteins and nucleic acids: Practical considerations. *High-Perform. Liq. Chromatogr.*, 4, 1-44.
- SANTANGELO J.D. - 1988. A general purpose computer analysis system for chromatographic data. *Computer Appl. Biosci.*, 4 (2), 275-279.
- SCOPE S R.K. - 1987. Classical and modern techniques in protein purification. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., New. Ser.*, 68, 1-15.
- SIMPSON R.J., MORITZ R.L., NICE E.E. and GREGO B. - 1987. A high-performance liquid chromatography procedure for recovering subnanomole amounts of protein from SDS-gel electroeluates for gas-phase sequence analysis. *Eur. J. Biochem.*, 165 (1), 21-29.
- STEVENS F.J. - 1989. Size-exclusion high-performance liquid chromatography in analysis of protein and peptide epitopes. *Methods Enzymol.*, 178, 107-130.
- STEVENS F.J., CARPEROS W.E., MONAFO W.J. and GREENSPAN N.S. - 1988. Size-exclusion HPLC analysis of epitopes. *J. Immunol. Methods* 108, 1-2, 271-278.
- WAJCMAN H. - 1989. Recent progress in the application of HPLC to protein separation. *Colloq. INSERM*, 175 (Biotechnol. Prot ines Plasma, 137-143.
- WITHKA J., MONCUSE P., BAZIOTISA. and MASKIEWICZ R. - 1987. Use of high-performance size-exclusion, ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography for the measurement of protein conformational change and stability. *J. Chromatogr.*, 398, 175-202.
- YANG Y.B. and VERZELE M. - 1987. High-speed and high-performance size-exclusion chromatography of proteins on a new hydrophilic polystyrene-based resin. *J. Chromatogr.*, 391 (2), 383-393.

2) Application de la CLHP au contrôle des blés et des farines

a) Analyse des protéines par CLHP

- Années antérieures à 1986

- BIETZ J.A. - 1983. Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 255, 219-238.
- BIETZ J.A. - 1984. Analysis of wheat gluten proteins by reversed-phase high-performance liquid-chromatography: techniques and applications. *Proceedings of the 2nd International Workshop on Gluten Proteins*, pp. 1-12
- BIETZ J.A., BURNOUF T., COBB L.A. and WALL J.S. - 1984. Gliadin analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography: optimisation of extraction conditions. *Cereal Chem.*, 61 (2), 124-129.
- BURNOUF T. and BIETZ J.A. - 1984. Reversed-phase liquid chromatography of reduced glutenin, a disulfide-bonded protein of wheat endosperm. *J. Chromatogr.*, 299, 185-199.

- HUEBNER F.R. and BIETZ J.A. - 1985. Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 327, 333-342.
- HUEBNER F.R. and BIETZ J.A. - 1984. Separation of wheat gliadins by preparative reversed-phase, high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 61 (5), 449-454.
- HUEBNER F.R., LIEBERMAN K.W., RUBINO R.P. and WALL J.S. - 1984. Demonstration of high opioid-like activity on isolated peptides from wheat gluten hydrolysates. *Peptides*, 5, 1139-1147.
- KRUGER J.E. and MARCHYLO B.A. - 1985. Selection of column and operating conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins in canadian wheat. *Can. J. Plant Sci.*, 65, 285-298.
- MOONEN J.H.E., SCHEEPSTRAA. and GRAVELANDA. - 1985. Biochemical properties of some high molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.*, 3, 17-27.

- Année 1986

- BIETZ J.A. - 1986. HPLC of cereal proteins. In "Advances in Cereal Science and Technology" (Y. Pomeranz, Ed.) American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minn., USA, Vol. 8, pp. 105-170.
- HUEBNER F.R. and BIETZ J.A. - 1986. Assessment of the potential breadmaking quality of hard wheats by reversed-phase high-performance liquid chromatography of gliadins. *J. Cereal Sci.*, 4, 370-388.
- LOOKHART G.L., ALBERS L.D. and BIETZ J.A. - 1986. Comparison of polyacrylamide gel and high-performance liquid chromatography analyses of gliadin polymorphism in the wheat cultivar Newton. *Cereal Chem.*, 63 (6), 497-500.
- ORSI F. and BEKES F. - 1986. Investigation of cereal proteins by HPLC. In: "Chromatography '85", Symp. Biol. Hung., 34, 233-40. (H. Kalasz and L.S. Ettre, Eds), Akademiai Kiado, Budapest, 1986.
- TWEETEN K.A. and TWEETEN T.N. - 1986. Reversed-phase chromatography of proteins on resin-based wide-pore packings. *J. Chromatogr.*, 359, 111-119.
- WINDEMANN H., MEIER P. and BAUMGARTNER E. - 1986. Detection of wheat gliadins in heated foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography (in German). *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 183 (1), 26-32.

- Année 1987

- AUTRAN J.C. - 1987. Biochemical tests for the evaluation of wheat technological: Their potential in breeding programs. In: "Proc. Seminar on Hard Wheats in the E.E.C.: Agronomical, Biochemical, Genetic and Technological Aspects (B. Borghi, Ed.), San Angelo Lodigiano (Milano), 3-5 june, pp. 19-37. *Tecnica Molitoria*, 38, 7, 557-558.
- BELITZ H.D., KIM J.J., KIEFFER R., SEILMEIER W., WERBECK U., WIESER H. - 1987. Separation and characterization of reduced glutelins from different wheat varieties and importance of the gliadin/glutenin ratio for the strength of gluten. *Proc. 3rd International Workshop on Gluten Proteins, 6-9 May, Budapest, Hongrie (F. Bekes, Ed.), pp. 189-205.*
- BIETZ J.A. and HUEBNER F.R. - 1987. Prediction of wheat quality by computer evaluation of reversed-phase high-performance liquid chromatograms of gluten proteins. *Proc. 3rd International Workshop on Gluten Proteins, 6-9 May, Budapest, Hongrie (F. Bekes, Ed.), pp. 173-188.*
- BURNOUF T. and BIETZ J.A. - 1987. Identification of wheat cultivars and prediction of quality by reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of endosperm storage proteins. *Seed Sci. Technol.*, 15 (1), 79-99.

- HUEBNER F.R. and BIETZ J.A. - 1987. Improvements in wheat proteins analysis and quality prediction by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 64 (1), 15-20.
- LOOKHART G.L. and ALBERS L.D. - 1987. Characterization of individual RP-HPLC prolamin peaks, of two closely-related wheat genotypes that differ in baking quality, by acid and SDS-PAGE. Proc. 3rd International Workshop on Gluten Proteins, 6-9 May, Budapest, Hongrie (F. Bekes, Ed.), pp. 125-140.
- MENKOVSKA M., LOOKHART G.I. and POMERANZ Y. - 1987. Changes in gliadin fractions during breadmaking: Isolation and characterization by high-performance liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.*, 64 (4), 311-314.
- ORSI F., PALLAGI E., BEKES F. and LASZTITY R. - 1987. Investigation of wheat proteins by high performance gel chromatography. Proc. 3rd International Workshop on Gluten Proteins, 6-9 May, Budapest, Hongrie (F. Bekes, Ed.), pp. 141-160.
- POPINEAU Y. et PINEAU F. - 1987. Investigation of surface hydrophobicities of purified gliadins by hydrophobic interaction chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and apolar ligand binding. *J. Cereal Sci.*, 5, 215-231.
- SEILMEIER W., WIESER H. and BELITZ H.D. - 1987. High-performance liquid chromatography of reduced glutenin: Amino acid composition of fractions and components. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 185 (6), 487-489.
- WIESER H., MOEDLÅ., SEILMEIER W. and BELTZ H.-D. - 1987. High-performance liquid chromatography of gliadins from different wheat varieties: Amino acid composition and N-terminal amino acid sequence of components. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 185 (5), 371-378.
- WIESER H., SEILMEIER W. and BELITZ H.-D. - 1987. Comparative investigations of partial amino acid sequences of prolamins and glutelins from cereals. VII. Amino acid sequences of prolamin peptides. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 184 (5), 366-373.
- WRIGLEY C.W., BATEY I.L., CAMPBELL W.P. and SKERRITT J.H. - 1987. Complementing traditional methods of identifying cereal varieties with novel procedures. *Seed Sci. Technol.*, 15, 679-688.

- Année 1988

- AUTRAN J.C., AIT-MOUH O. and FEILLET P. - 1988. Thermal modification of gluten as related to end-use properties. Presented at the Wheat Industry Utilization Conference (National Association of Wheat Growers Foundation), October 7-8, 1988, San Diego, California.
- AUTRAN J.C., DACHKEVITCH T. and FEILLET P. - 1988. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of bread wheat and durum wheat proteins: An efficient tool for predicting quality in breeding programs and investigating physico-chemical basis of quality. Presented at the 73rd Meeting of the American Association of Cereal Chemists, October 9-13, 1988, San Diego, California.
- CHRISTIE W.W. and MORRISON W.R.. - 1988. Separation of complex lipids of cereals by high-performance liquid chromatography with mass detection. *J. Chromatogr.*, 436 (3), 510-513.
- FREEDMANÅ.R., WIESER H., ELLIS H.J. and CICLITIRA P.J. - 1988. Immunoblotting of gliadins separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography: detection with monoclonal antibodies. *J. Cereal Sci.*, 8 (3), 231-238.
- HUEBNER F.R. and BIETZ J.A. - 1988. Quantitative variation among gliadins of wheats grown in different environments. *Cereal Chem.*, 65 (4), 362-366.
- KOCNA P., FRIC P., KOCOVA-HOLAKOVA M., SLABY J., KASAFIREK E. and HEKKENS W.T.J.M. - 1988. Isolation and analysis of peptidic fragments of alpha-gliadin using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 434 (2), 429-438.

- KRUGER J.E., MARCHYLO B.A. and HATCHER D. - 1988. Preliminary assessment of a sequential extraction scheme for evaluating quality by reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrophoretic analysis of gliadins and glutenins. *Cereal Chem.*, 65 (3), 208-214.
- LOOKHART G.L. and ALBERS L.D. - 1988. Correlations between reversed-phase high-performance liquid chromatography and acid- and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic data on prolamins from sister lines differing in baking quality. *Cereal Chem.*, 65 (3), 222-227.
- MARCHYLO B.A. and KRUGER J.E. - 1988. The effect of injection volume on the quantitative analysis of wheat storage proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 65 (3), 192-198.
- MARCHYLO B.A., HATCHER D.W. and KRUGER J.E. - 1988. Identification of wheat cultivars by reversed-phase high-performance liquid chromatography of storage proteins. *Cereal Chem.*, 65 (1), 28-40.
- MENKOVSKA M., POMERANZ Y., LOOKHART G.L. and SHOGREN M.D. - 1988. Gliadin in crumb of bread from high-protein wheat flours of varied breadmaking potential. *Cereal Chem.*, 65 (3), 198-201.
- OKADA K., NEGISHI Y. and NAGAO S. - 1988. Characterization of acid-soluble and insoluble proteins isolated from doughs mixed in the presence of N-Ethylmaleimide. *Cereal Chem.*, 65 (3), 248-252.
- SEILMEIER W., WIESER H. and BELITZ H.D. - 1988. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of reduced glutenins from different wheat varieties. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 187 (2), 107-110
- WIESER H., SEILMEIER W. and BELITZ H.-D. - 1988. Comparative investigations of partial amino acid sequences of prolamins and glutelins from cereals. VIII. Amino acid sequences of glutelin peptides. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.* 187 (1), 27-34.
- WINDEMANN H. - 1988. Detection of wheat proteins in foods. *Swiss Food*, 10 (4a), 39-41.

- Année 1989

- AIT-MOUH O. - 1989. Influence des conditions de séchage à haute température sur les propriétés des pâtes alimentaires. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 127p.
- AUTRAN J.C., AIT-MOUH O. and FEILLET P. - 1989. Thermal modification of gluten as related to end-use properties. In "Wheat is Unique: Structure, Composition, Processing, End-Use Properties, and Products" (Y. Pomeranz, ed.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA. Chap. 33, pp. 563-593.
- BATEY I.L., WRIGLEY C.W. and GRAS P.W. - 1989. Novel approaches to grain quality and process control. In "Wheat is Unique: Structure, Composition, Processing, End-Use Properties, and Products" (Y. Pomeranz, ed.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 161-176.
- BIETZ J.A. - 1989. Telling differences among wheat proteins may make a difference in marketing. In "Wheat is Unique: Structure, Composition, Processing, End-Use Properties, and Products" (Y. Pomeranz, ed.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 303-318.
- BUNKER J.R., LOCKERMAN R.H., McGUIRE C.F., BLAKE T.K. and ENGEL R.E. - 1989. Soil moisture effects on bread loaf quality and evaluation of gliadins with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 66 (5), 427-431.

- BURNOUF T. and BIETZ J.A. - 1989. Rapid purification of wheat glutenin for reversed-phase high-performance liquid chromatography. Comparison of dimethyl sulfoxide with traditional solvents. *Cereal Chem.*, 66 (2), 121-127.
- CODOVILLI F. - 1989. Identification of the LMW glutenin subunits by RP-HPLC and their relationship with bread-making quality in Italian wheat varieties (in Italian). *Tecnica Molitoria*, 40 (2), 81-86.
- DACHKEVITCH T. - 1989. Etude des complexes protéiques du blé tendre par chromatographie liquide à haute performance de tamisage moléculaire (SE-HPLC): relation avec la qualité technologique. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 127p.
- DACHKEVITCH T. and AUTRAN J.C. - 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 66 (6), 448-456.
- DEXTER J.E., MARCHYLO B.A., MACGREGOR A.W. and TKACHUK R. - 1989. The structure and protein composition of vitreous, piebald and starchy durum wheat kernels. *J. Cereal Sci.*, 10, 19-32.
- FEILLET P., AIT-MOUH O., KOBREHEL K. and AUTRAN J.C. - 1989. The role of low molecular weight glutenins in the determination of cooking quality of pasta products: An overview. *Cereal Chem.*, 66 (1), 26-30.
- HUEBNER F.R. - 1989. Assessment of potential breadmaking quality of hard spring wheats by high-performance liquid chromatography of gliadins - Year two. *Cereal Chem.*, 66 (4), 333-337.
- LOOKHART G.L., MENKOVSKA M. and POMERANZ Y. - 1989. Polyacrylamide gel electrophoresis and high-performance liquid chromatography patterns of gliadins from wheat sections and milled and air-classified fractions. *Cereal Chem.*, 66 (4), 256-262.
- LUNDH G. and MACRITCHIE F. - 1989. Size exclusion HPLC characterisation of gluten protein fractions varying in breadmaking potential. *J. Cereal Sci.*, 10, 247-253.
- MARCHYLO B.A., KRUGER J.E. and HATCHER D.W. - 1989. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of wheat storage proteins as a potential quality prediction tool. *J. Cereal Sci.*, 9 (2), 113-130.
- MASSON P., POPINEAU Y. and PINEAU F. - 1989. Limited hydrolysis of gamma-gliadin by pepsin: fractionation and partial characterisation of large polypeptides. *Lebensm. -Wiss. Technol.*, 22 (4), 157-163.
- NG P.K.W., SCANLON M.G. and BUSHUK W. - 1989. Electrophoretic and high-performance liquid chromatography patterns of registered wheat cultivars. *Cereal Res. Commun.*, 17 (1), 5-10.
- POMERANZ Y., LOOKHART G.L., RUBENTHALER G.L. and ALBERTS L.A. - 1989. Changes in gliadin proteins during cookie making. *Cereal Chem.*, 66 (6), 532-534.
- SAPIRSTEIN H.D., SCANLON M.G. and BUSHUK W. - 1989. Normalization of high-performance liquid chromatography peak retention times for computerizing comparison of wheat prolamin chromatograms. *J. Chromatogr.*, 469, 127-135.
- SCANLON M.G., SAPIRSTEIN and BUSHUK W. - 1989. Computerized wheat varietal identification by high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 66 (5), 439-443.
- SCANLON M.G., SAPIRSTEIN H.D. and BUSHUK W. - 1989. Evaluation of the precision of high-performance liquid chromatography for wheat cultivar identification. *Cereal Chem.*, 66 (2), 112-116.
- SINGH N.K. and MACRITCHIE F. - 1989. Controlled degradation as a tool for probing wheat protein structure. In: *Wheat End-Use Properties, Proceedings from ICC'89* (H. Salovaara, Ed.), University of Helsinki, June 13-15, Lahti, Finland. pp. 321-338.

- SUTTON K.H., HAY R.L. and GRIFFIN W.B. - 1989. Assessment of the potential bread baking quality of New Zealand wheats by RP-HPLC of glutenins. *J. Cereal Sci.*, 10, 113-121.
- WERBECK U., SEILMEIER W. and BELITZ H.D. - 1989. Partial reduction of wheat glutelin by mercaptoethanol and dithio-erythritol. II. Investigations by reversed-phase high performance liquid chromatography (in German). *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 188 (1), 22-27.
- WIESER H., SEILMEIER W. and BELITZ H.-D. - 1989. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of ethanol-soluble and ethanol-insoluble reduced glutenin fractions. *Cereal Chem.*, 66 (1), 38-41.
- WIESER H., SEILMEIER W. and BELITZ H.D. - 1989. Extractability of glutenins with water/alcohol mixtures under reducing conditions. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 189 (3), 223-228.
- WRIGLEY C.W., TOMLINSON J.D., SKERRITT J.H., BATEY I.L. and SING W. - 1989. Efficient identification of wheat varieties by established and novel procedures. *Cereal Foods World*, 34 (8), 629-632.

- Année 1990

- BERTRAND D., COURCOUX P., AUTRAN J.C., MERITAN R. and ROBERT P. - 1990. Stepwise factorial discriminant analysis of continuous digitalized signals. Application to chromatograms of wheat proteins. *Journal of Chemometrics*, 4, 413-427.
- BIETZ J.A. - 1990. HPLC of cereal endosperm storage proteins. *Chromatogr. Sci.*, 51 (HPLC Biol. Macromol.), 429-455.
- DALLA L.L. - 1990. Modification of the selectivity of a reversed-phase high-performance liquid chromatography system by binding sodium dodecyl sulfate to peptides. *J. Chromatogr.*, 507, 45-49.
- ENDO S., OKADA K., NAGAO S. and D'APPOLONIA B.L. - 1990. Quality characteristics of hard red spring and winter wheats. Differentiation by reversed-phase high performance liquid chromatography and milling properties. *Cereal Chem.*, 67 (5), 480-485.
- ENDO S., OKADA K., NAGAO S. and D'APPOLONIA B.L. - 1990. Quality characteristics of hard red spring and winter wheats. II. Statistical evaluation of reversed-phase high performance liquid chromatography and milling data. *Cereal Chem.*, 67 (5), 486-489.
- HUEBNER F.R., KACKOWSKI J. and BIETZ J.A. - 1990. Quantitative variation of wheat proteins from grain at different stages of maturity and from different spike locations. *Cereal Chem.*, 67 (5), 464-470.
- LOOKHART G.L. and BIETZ J.A. - 1990. Practical wheat varietal identification in the United States. *Cereal Foods World*, 35 (4), 404-407.
- MCCARTHY P.K., SCANLON B.F., LUMLEY I.D. and GRIFFIN M. - 1990. Detection and quantification of adulteration of durum wheat flour by flour from common wheat using reversed phase HPLC. *J. Sci. Food Agric.*, 50 (2), 211-226.
- MERITAN R. - 1990. Etude des protéines de blé tendre par chromatographie liquide à haute performance de tamisage moléculaire: contribution à l'appréciation de la qualité boulangère. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 154p.
- POLLINI C. and TONATELLO C. - 1990. HPLC characterization of proteins during pasta production. *New trends in cereal food, Symposium ICC, Vienne.*
- POPINEAU Y., MASSON P., PINEAU F. and GUARY J.C. - 1990. Limited hydrolysis of a gamma-type gliadin by chymotrypsin: isolation of specific sequence domains. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 23 (6), 474-480.

- PRIETO J.A., COLLAR C. and BENEDITO DE BARBER C. - 1990. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of biochemical changes in free amino acids during wheat flour mixing and bread baking. *J. Chromatogr. Sci.*, 28, 572-577.
- SCANLON M.G., NG P.K.W. and BUSHUK W. - 1990. Suitability of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of wheat proteins for long-term statistical assessment of breadmaking quality. *Cereal Chem.*, 67 (4), 395-399.
- SCANLON M.G. and BUSHUK W. - 1990. Application of photodiode-array detection in RP-HPLC of gliadins for automated wheat variety identification. *J. Cereal Sci.*, 12 (3), 229-234.
- SEILMEIER W., WIESER H. and BELITZ H.D. - 1990. Wheat during maturation: analysis of gliadins and glutenin by RP-HPLC. (in German). *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 191 (2), 99-103.
- SINGH N.K., DONOVAN G.R., and MacRITCHIE F. - 1990. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. II. Relative quantity of glutenin as a measure of breadmaking quality. *Cereal Chem.*, 67 (2), 161-170.
- SINGH N.K., DONOVAN G.R., BATEY I.L. and MacRITCHIE F. - 1990. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chem.*, 67 (2), 150-161.
- SKERRITT J.H. and MACRITCHIE F. - 1990. Interaction between glutenin polypeptides: simple antibody and HPLC-based methods for prediction of gluten strength. Exposé au Congrès de l'Association Internationale de Chimie Céréalière, Vienne, Mai 1990.
- SUTTON K.H. and HAY R.L. - 1990. Quantitation of rye in wheat/rye wholemeal mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.*, 12, 25-32.
- SUTTON K.H., HAY R.L., MOUAT C.H. and GRIFFIN W.B. - 1990. The influence of environment, milling and blending on assessment of the potential breadbaking quality of wheat by RP-HPLC of glutenin subunits. *J. Cereal Sci.*, 12 (2), 145-153.
- WIESER H., SEILMEIER W. and BELITZ H.-D. - 1990. Characterization of high molecular weight subunits of glutenin separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.*, 12 (3), 223-227.
- WIESER H., SEILMEIER W. and BELITZ H.D. - 1990. Characterization of ethanol-extractable reduced subunits of glutenin separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.*, 12 (1), 63-71.

- Année 1991

- BATEY I.L., GUPTA R.B. and MacRITCHIE F. - 1991. Use of size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins: an improved chromatographic procedure. *Cereal Chem.*, 68 (2), 207-209.
- GODON B. - 1991. Des méthodes pour caractériser les glutens industriels. *Ind. Alim. Agric.*, 108 (3), 131-140.
- ISSAQ H.J., JANINI G.M., ATAMNA I.Z. and MUSCHNIK G.M. - 1991. Separations by high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis: a comparative study. *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (5), 817-845.

b) Analyse des autres constituants par CLHP

- BOLEY N.P. and BURN M.J.S. - 1990. The determination of starch in composite foodstuffs by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.*, 36, 45-51.

- CHRISTIE W.W. and MORRISON W.R. - 1988. Separation of complex lipids of cereals by high-performance liquid chromatography with mass detection. *J. Chromatogr.*, 436, 510-513.
- HAAKANSSON B., JAEGERSTAD M. et OESTE R. - 1987. Determination of vitamin E in wheat products by HPLC. *J. Micronutr. Anal.*, 3 (4), 307-318.
- HAMMOND E.W. - 1989. Chromatographic techniques for lipid analysis. *Trends Anal. Chem.*, 8 (8), 308-312.
- MATSUNAGAA., YAMAMOTOA. and MIZUKAMI E. - 1988. Determination of phytic acid in various foods by indirect photometric ion chromatography (In Japan). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 29 (6), 408-412.
- MATSUNAGAA., YAMAMOTOA. and MIZUKAMI E. - 1989. Determination of inositol phosphates in foods by high-performance liquid chromatography (In Japan). *Toyama-ken Eisei Kenkyusho Nenpo*, 12, 157-161.
- OSBORNE B.G. - 1986. High-performance liquid chromatography of azodicarbonamide. *J. Chromatogr.*, 368, 401-404.
- PRIETO J.A., COLLAR C. and BENEDITO DE BARBER C. - 1989. Determination of biochemical changes in free amino acids during wheat flour mixing and bread baking by optimized reversed-phase high performance liquid chromatography. In: *Agriculture, Food Chemistry and the Consumer, Proceedings of the fifth European Conference on Food Chemistry, Versailles, September 27-29, INRA*, pp 170-174.
- PUSSAYANAWIN V. and WETZEL D.L. - 1987. High-performance liquid chromatography of ferulic acid in wheat milling fractions as a measurement of bran contamination. *J. Chromatogr.*, 391, 243-255.
- PUSSAYANAWIN V., WETZEL D.L. and FULCHER R.G. - 1988. Fluorescence detection and measurement of ferulic acid in wheat milling fractions by microscopy and HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 515-520.
- REYES E.S.P. and SUBRYAN L. - 1989. An improved method of simultaneous HPLC assay of riboflavin and thiamin in selected cereal products. *J. Food Compos. Anal.*, 2 (1), 41-47.
- SAKANO T. and NOTSUMOTO S. - 1988. Measurement of K vitamins in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection (in Japan). *Bitamin*, 62 (8), 393-398.
- TSUGE H. and HIROSE N. - 1989. HPLC Analysis of vitamin B6 derivatives (in Japan). *Bitamin*, 63 (8), 349-360.
- TUTELYAN V.A., SOBOLEV V., RYBAKOVA N.V. and ELLER K.I. - 1989. A survey using normal phase HPLC of aflatoxins in domestic and imported foods and dairy products in the USSR. *J. Toxicol.*, 8 (1-2), 375-387.
- WALKER G.C. - 1988. Determination of flour glycolipids as their benzoyl derivatives by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *Cereal Chem.*, 65 (5), 433-435.
- WEHLING R.L. and WETZEL D.L. - 1984. Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin, and thiamin in fortified cereal products by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1326-1331.