

CHROM. 6346

Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits

Parmi les techniques ayant permis de réaliser de rapides progrès dans la connaissance des composés phénoliques des végétaux, la chromatographie sur papier et sur couche mince occupent une place de choix. Plus récemment, la technique d'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour séparer des composés phénoliques dont certains, parmi les plus simples, peuvent être étudiés sans transformation chimique préalable^{1,2}; mais, en général, il est nécessaire de les rendre plus volatils par méthylation³ ou dans les cas les plus complexes, comme celui des polyphénols d'origine végétale, en les transformant en dérivés silylés⁴⁻⁷. Ces analyses portent sur des mélanges de composés témoins et sont essentiellement qualitatives; quelques acides phénoliques simples (acides *p*-coumarique et férulique) présents dans les produits de dégradation de la lignine ont cependant pu être dosés par cette technique².

Le but de ce travail est de séparer, d'identifier et de doser certains composés phénoliques complexes (l'acide chlorogénique et les catéchines) qui sont bien représentés dans les fruits. Notre étude a porté sur les extraits de fruits de *Pirus Malus* L. et de *Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme* (tomate "cerise").

Matériel et méthodes

L'appareil utilisé (Girdel F D 75) est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne métallique inoxydables (diamètre 1/8 de pouce, longueur 3 m). Le support inerte de cette colonne (Chromosorb Q, 60-80 mesh) est imprégné à 3% d'une phase stationnaire à groupements méthyl (Silicone SE-30 ou de préférence Silicone OV-1, qui est plus stable à des températures élevées). Le gaz vecteur (azote) est débité à 1.2 l/h, les débits d'hydrogène et d'air comprimé étant respectivement de 1.2 l/h et de 24 l/h.

Préparation des extraits. Toutes les phases de l'extraction sont conduites à une température voisine de 0°. Le matériel végétal lyophilisé est broyé au broyeur à billes (type Dangoumau), la poudre obtenue étant alors reprise par un mélange d'éthanol et d'eau (80:20). Après 30 min d'agitation, l'extrait est filtré et le résidu est épuisé plusieurs fois par de l'alcool à 80%. Le filtrat obtenu contient les composés phénoliques et de nombreux autres composés (pigments, acides organiques, sucres, etc.) qui doivent être éliminés avant l'étude par chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, l'éthanol est évaporé sous vide à 30° et l'extrait aqueux obtenu est alors débarrassé des chlorophylles et des pigments caroténoïdes par trois extractions (v/v) à l'éther de pétrole. Il est d'autre part indispensable d'éliminer la plus grande partie des sucres de l'extrait; en effet, ils y sont très abondants et pourraient entrer en compétition avec les composés phénoliques au moment de la silylation. Dans ce but, l'extrait aqueux peut être traité de deux manières différentes:

(i) Après avoir ajouté à cet extrait un volume au moins égal d'alcool isoamylique, on évapore sous vide à 30°. L'eau est entraînée dans l'azéotrope avec l'isoamylol et les sucres insolubles dans cet alcool précipitent, les composés phénoliques restant dans le surnageant isoamylique.

(ii) Il est également possible d'extraire les composés phénoliques par l'acétate

d'éthyle, après avoir acidifié et renforcé la force ionique de l'extrait aqueux (par adjonction de 2% d'acide métaphosphorique et de 20% de sulfate d'ammonium). La majorité des composés phénoliques passe dans l'acétate d'éthyle, le rendement étant de 100% pour l'acide chlorogénique et les catéchines si la phase aqueuse est extraite quatre fois (v/v) par l'acétate d'éthyle. Les extraits ainsi obtenus sont évaporés à sec.

Silylation des composés phénoliques. Les composés phénoliques étudiés sont transformés en composés volatilisables et stables aux températures élevées par triméthylsilylation selon le mode expérimental défini par PELLIZARI *et al.*⁷: les témoins utilisés ainsi que les extraits évaporés à sec sont dissous dans 0.6 ml de pyridine anhydre, puis la triméthylsilylation est réalisée par addition de 0.3 ml d'hexaméthyl-disilasane et 0.1 ml de triméthylchlorosilane, à la température du laboratoire. Le mélange est agité vigoureusement pendant 1 min puis on laisse se déposer lentement le précipité de chlorure d'ammonium; les dérivés silylés des composés phénoliques présents dans le surnageant peuvent alors être séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse.

Principe de la détermination et du dosage des composés phénoliques des extraits. La détermination des pics des chromatogrammes obtenus après injection des extraits repose tout d'abord sur la comparaison de leurs distances de rétention à celles de substances témoins étudiées dans les mêmes conditions. Ces identifications sont confirmées par introduction dans l'extrait d'une surcharge en témoin qui est supposé correspondre à l'un des pics. De plus, différents traitements chimiques (hydrolyse alcaline, extraction par divers solvants, etc.) ayant pour but de faire disparaître spécifiquement un des constituants de l'extrait, permettent de vérifier qu'à chacun des pics du chromatogramme ne correspond qu'un seul composé.

Le dosage des composés phénoliques est basé sur l'utilisation d'un étalonnage interne⁸, selon une méthode décrite et appliquée à certains constituants des végétaux par divers auteurs (GEHRKE *et al.*⁹ pour les acides aminés, DAVISON ET YOUNG¹⁰, KIMURA *et al.*¹¹, DE MINIAC¹² et GOLDBERG ET ROLAND¹³ pour les sucres). Cette méthode repose sur le choix d'un étalon interne et sur l'étalonnage des réponses du détecteur pour chacun des composés par rapport à cet étalon. Parmi un certain nombre de composés, susceptibles d'être utilisés comme étalon interne, nous avons retenu le raffinose; en effet, le pic de son dérivé silylé n'interfère avec aucun des pics présents dans les extraits et, de plus, la réponse du détecteur est parfaitement proportionnelle à la quantité injectée. Les courbes d'étalonnage sont établies en injectant des quantités croissantes de chacun des composés témoins (acide chlorogénique de 0.8 à 6 μg ; (+)-catéchine de 0.3 à 5 μg), la quantité d'étalon interne étant gardée constante pour toutes les expériences (5.76 μg).

Résultats qualitatifs

Diverses températures d'analyse (200, 280 et 330°) ont été utilisées pour séparer correctement les composés témoins étudiés. À 200° (Fig. 1A et B), les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique (acides *p*-coumarique, férulique, caféique) ou dérivés de l'acide benzoïque (acide gallique, etc.) sont détectés et séparés ainsi que certains acides organiques (acides quinique et shikimique en particulier).

Les températures plus élevées ont permis de détecter des molécules plus complexes comme l'acide chlorogénique, la (+)-catéchine, le kaempférol à 280° (Fig. 1C) et la phloridzine (glucoside de la phlorétine) à 330° (Fig. 1D).

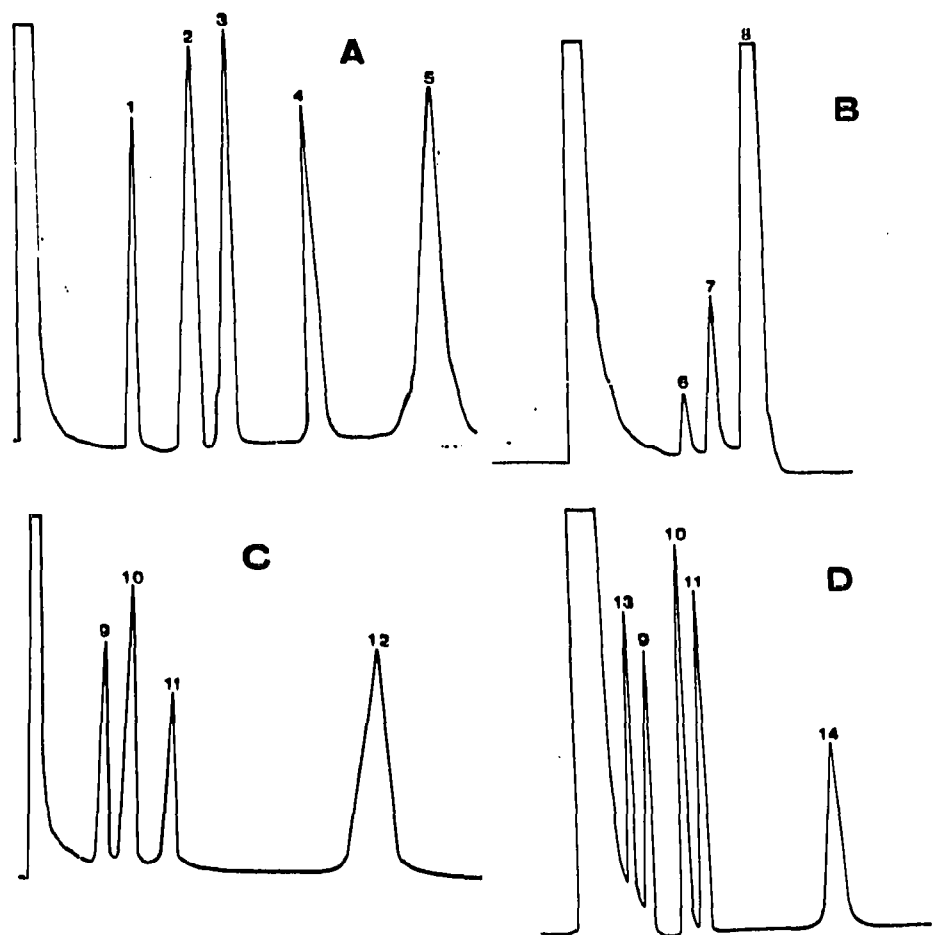


Fig. 1. Chromatogrammes obtenus à 200° (A et B), à 280° (C) et 330° (D) de mélanges de composés témoins: acides shikimique (1), quinique (2), gallique (3), férulique (4), caféique (5), *o*-, *m*- et *p*-coumariques (6, 7 et 8); (+)-catéchine (9), kaempférol (10), acide chlorogénique (11), raffinose (12), phlorétine (13) et phloridzine (14).

La séparation de ces composés est basée sur les différences de poids moléculaire et sur le nombre d'hydroxyles phénoliques ou non présents dans la molécule⁴. Dans le cas particulier des acides *o*-, *m*- et *p*-coumariques, la séparation semble due aux configurations stéréochimiques différentes de leurs molécules.

Les composés phénoliques complexes présents dans les extraits étudiés étant bien séparés à 280°, c'est à cette température que nous les avons identifiés et dosés.

Le chromatogramme des extraits de parenchyme de pommes (Fig. 2A) montre plusieurs pics dont les deux plus importants ont été identifiés aux catéchines et à l'acide chlorogénique. Le chromatogramme obtenu à partir des extraits de tomates "cerise" récoltées à la fin de la croissance ne présente qu'un seul pic important, correspondant à l'acide chlorogénique (Fig. 2B).

Dosage de l'acide chlorogénique et des catéchines

Nous avons tout d'abord vérifié que, pour chacun de ces composés, la réponse du détecteur est linéaire; cependant, les coefficients de proportionnalité ainsi déterminés sont très variables au cours du temps car, aux températures d'analyse élevées, la

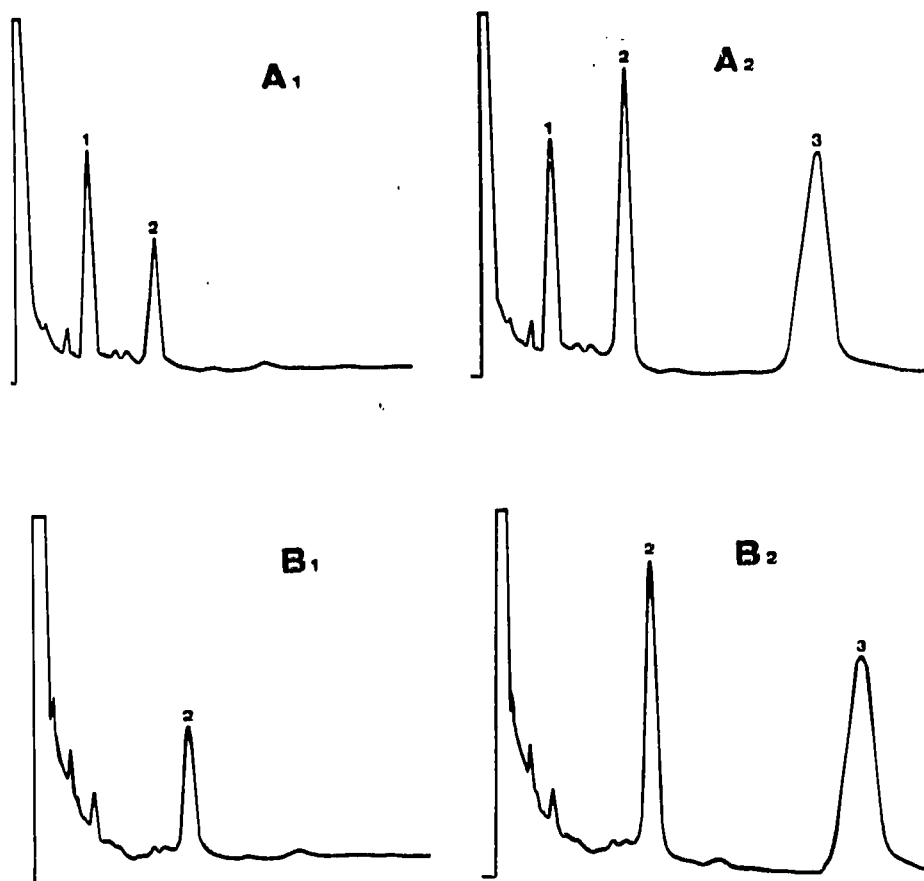


Fig. 2. Analyses à 280° des extraits de parenchyme de pommes (A₁) et de tomates "cerise" (B₁) et de ces mêmes extraits en présence de l'étalon interne (pic No. 3) et d'une surcharge en acide chlorogénique (chromatogrammes A₂ et B₂). Le pic No. 1 est identifié à la (+)-catéchine et le pic No. 2 à l'acide chlorogénique.

phase stationnaire des colonnes évolue rapidement. Ces variations, trop importantes, nous ont conduits à utiliser une méthode de dosage par étalonnage interne. Dans ce cas, les réponses obtenues relativement à l'étalon interne choisi sont linéaires pour des quantités supérieures à 0.6 μg (acide chlorogénique) et 0.2 μg ((+)-catéchine) (Fig. 3); le calcul de l'équation des droites et leur tracé ont été faits selon la méthode des moindres carrés. Ces courbes d'étalonnage permettent alors de calculer les quantités d'acide chlorogénique et de catéchines présentes dans quelques extraits (Tableau I).

L'étude de ce tableau montre que l'utilisation de l'acétate d'éthyle ou de l'alcool isoamylique, pour purifier les extraits, conduit dans les deux cas à des résultats très comparables pour l'acide chlorogénique. D'autre part, la teneur en acide chlorogénique et en catéchines du parenchyme de pommes est nettement plus importante dans le plus jeune fruit; ceci est d'ailleurs une donnée classique déjà obtenue à l'aide d'autres techniques de dosage¹⁴⁻¹⁶.

Discussion

Il est donc possible de séparer et de doser correctement certains composés phénoliques en utilisant la chromatographie en phase gazeuse. Il reste cependant indispensable d'étudier quels sont les facteurs susceptibles de modifier qualitative-

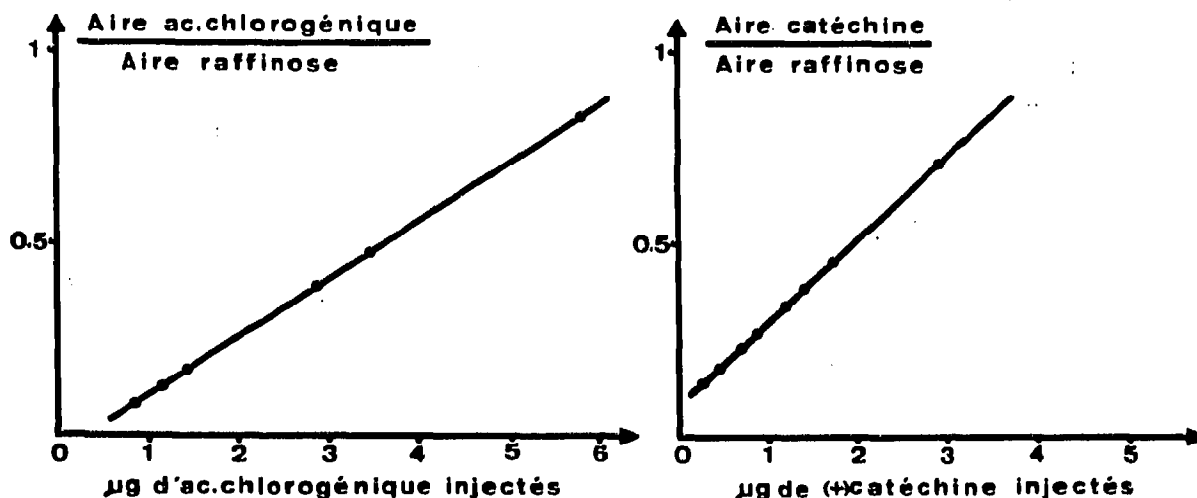


Fig. 3. Étalonnage de la réponse du détecteur en fonction des quantités d'acide chlorogénique et de (+)-catéchine injectées. La quantité d'étalon interne est gardée constante.

TABLEAU I

DOSAGE DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE ET DES CATÉCHINES DES EXTRAITS DE POMMES ET DE TOMATES "CERISE"

Les résultats sont exprimés en mg/g de matière sèche de fruit. Chaque valeur est la moyenne de quinze dosages, l'intervalle de confiance des moyennes étant calculé pour $P = 95\%$.

	<i>Pommes</i>		<i>Tomates "cerise"</i>	
	<i>Extrait isoamylique</i>		<i>Extrait isoamylique</i>	<i>Extrait acétate d'éthyle</i>
	<i>Fruits récoltés le 24 mai</i>	<i>Fruits récoltés le 16 juin</i>		
Acide chlorogénique	5.57 ± 0.19	4.40 ± 0.46	3.05 ± 0.37	3.06 ± 0.37
Catéchines	3.82 ± 0.35	3.07 ± 0.23	0	0

ment et quantitativement les résultats obtenus et de les comparer à ceux fournis par des méthodes de dosage plus classiques.

Importance des conditions de silylation. L'étude critique des conditions de silylation a porté essentiellement sur deux points: le choix du solvant et les conditions expérimentales. Les deux solvants classiquement utilisés sont la pyridine et la diméthylformamide. La silylation dans la pyridine est totale après 1 h et les dérivés silylés sont alors stables pendant des mois s'ils sont conservés à l'abri de toute trace de vapeur d'eau. Par contre, dans la diméthylformamide la réaction est complète après quelques minutes mais les dérivés sont instables et totalement hydrolysés au bout de 12 h. Ces résultats, en accord avec ceux de BOUDET *et al.*¹⁷ ont conduit à choisir la pyridine. La température à laquelle se fait la réaction semble sans influence, entre 0 et 100°, sur la réponse enregistrée. De même, la présence d'oxygène n'entraîne aucune variation par rapport au témoin traité sous azote. C'est d'ailleurs en présence d'air que CATROUX ET BLACHERE⁶ procèdent à la silylation de certains composés phénoliques alors que PELLIZARI *et al.*⁷ effectuent cette réaction sous atmosphère d'azote.

Ces études nous ont conduits au mode expérimental décrit précédemment, les seules précautions particulières à prendre étant d'effectuer les silylations et de conserver les dérivés silylés à l'abri de toute trace d'eau. Cette contrainte pourra d'ailleurs vraisemblablement être écartée par utilisation de nouveaux réactifs permettant la silylation en présence d'eau¹⁸.

Contrôle des résultats quantitatifs. Les résultats des dosages ont été contrôlés de deux manières différentes. D'une part, si une surcharge en acide chlorogénique est introduite dans une fraction aliquote d'un extrait, on la retrouve à 96% après silylation et dosage; les 4% manquants correspondent peut-être à des pertes au moment de la silylation. D'autre part, la détermination par dosage spectrophotométrique de la teneur d'un extrait en acide chlorogénique conduit à une valeur (5.49 mg/g de matière sèche de fruit) qui, bien qu'entachée d'une légère erreur systématique par défaut¹⁵, est nettement située dans l'intervalle de confiance ($P = 95\%$) de la moyenne des valeurs obtenues par chromatographie en phase gazeuse (5.57 ± 0.24 mg/g de matière sèche de fruit); les deux teneurs ainsi déterminées ne sont donc pas significativement différentes au seuil de probabilité choisi. Ces deux méthodes sont donc tout à fait comparables quantitativement, l'intérêt essentiel de la chromatographie en phase gazeuse reposant sur la précision d'analyse et sur la rapidité qui permet pour un même extrait de faire de nombreux dosages successifs.

L'étude des extraits par chromatographie sur papier permet cependant de mettre en évidence et de doser éventuellement divers composés qui ne sont pas identifiés ou détectés par chromatographie en phase gazeuse. Ainsi, la présence d'acide *p*-coumarylquinique et de *p*-coumaryl-glucose dans le parenchyme des pommes¹⁹, d'hétérosides de flavonols et de dérivés de l'acide férulique dans la tomate "cerise" (FLEURIET²⁰), n'est pas nettement mise en évidence ici. Diverses causes peuvent expliquer ce fait, en particulier les coefficients de réponse très faibles de certains composés, la perte possible d'hétérosides complexes au cours des opérations conduisant à la purification des extraits ou peut-être une silylation incomplète en fonction d'une compétition possible entre les divers composés présents.

La mise en évidence par chromatographie sur papier des composés phénoliques d'un extrait reste donc importante pour orienter l'identification des pics obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

Conclusion

La chromatographie en phase gazeuse permet donc de séparer et de doser quelques-uns des principaux composés phénoliques présents dans les extraits végétaux. Cette technique se révèle satisfaisante par sa précision, sa rapidité et sa grande sensibilité puisqu'elle permet de détecter et de doser des quantités inférieures à 1 μ g. Cependant, l'analyse et le dosage de tous les composés phénoliques d'un extrait ne peuvent se faire en travaillant à une seule température; en effet, l'ensemble de ces composés présente une très grande diversité portant sur le poids moléculaire et la structure, en particulier sur le nombre et la position des groupements hydroxyles. Les composés les plus complexes ne peuvent ainsi être étudiés qu'à des températures élevées (supérieures à 300°) ou après dégradation chimique ou enzymatique de leur molécule. Dans tous les cas, il sera indispensable d'analyser ces extraits à plusieurs

températures, en programmation de température et d'utiliser des phases stationnaires possédant des propriétés de rétention différentes.

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée,
Université de Paris, Paris VI (France)
et Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux (CNRS),
4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon (France)

A. FLEURIET
J. J. MACHEIX

- 1 R. O. C. NORMAN, J. R. LINDSAY-SMITH ET G. K. RADDA, dans J. B. PRIDHAM (Éditeur), *Methods in Polyphenols Chemistry*, Pergamon, Londres, 1963, p. 125.
- 2 R. D. HARTLEY, *J. Chromatogr.*, 54 (1971) 335.
- 3 A. C. BHATTACHARYA, A. BHATTACHARJEE, O. K. GUHA ET A. N. BASU, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1873.
- 4 T. FURUYA, *J. Chromatogr.*, 19 (1965) 607.
- 5 E. S. KEITH ET J. J. POWERS, *J. Food Sci.*, 31 (1966) 971.
- 6 G. CATROUX ET H. BLACHERE, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 262 (1966) 1345.
- 7 E. D. PELLIZZARI, C. M. CHUANG, J. KUC' ET E. B. WILLIAMS, *J. Chromatogr.*, 40 (1969) 285.
- 8 L. LEBBE, dans J. TRANCHANT (Éditeur), *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, Masson, Paris, 1968, p. 234.
- 9 C. W. GEHRKE, K. KUO ET R. W. ZUMWALT, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 209.
- 10 P. K. DAVISON ET R. YOUNG, *J. Chromatogr.*, 41 (1968) 12.
- 11 M. KIMURA, M. TOHMA, Y. OKAZAWA ET N. MURAI, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 110.
- 12 M. DE MINIAC, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270 (1970) 1583.
- 13 R. GOLDBERG ET J. C. ROLAND, *Rev. Gen. Bot.*, 78 (1971) 75.
- 14 A. C. HULME, *Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg.*, 4 (1958) 43.
- 15 J. J. MACHEIX, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 264 (1967) 3010.
- 16 J. J. MACHEIX, *Physiol. Veg.*, 8 (1970) 585.
- 17 A. BOUDET, G. ALIBERT ET J. L. PUECH, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52 (1970) 1119.
- 18 G. D. BRITTAIN, J. E. SULLIVAN ET L. R. SCHEWE, dans I. J. DOMSKY ET J. A. PERRY (Éditeurs), *Recent Advances in Gas Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1971, p. 223.
- 19 J. J. MACHEIX, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 272 (1971) 1097.
- 20 A. FLEURIET, travaux non publiés.

Reçu le 24 juillet 1972

J. Chromatogr., 74 (1972) 339-345