

CHROM. 6663

SÉPARATION ET DOSAGE AUTOMATISÉS DES ACIDES PHÉNOLIQUES VÉGÉTAUX PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE POLYCLAR ET SPECTROPHOTOMÉTRIE DANS L'ULTRA VIOLET

GILBERT ALIBERT

Enzymologie et Métabolisme, Équipe de Recherche Associée au C.N.R.S., Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Paul Sabatier, 118, Route de Narbonne, 31077 Toulouse (France)

(Reçu le 22 février 1973)

SUMMARY

Quantitative autoanalysis of phenolic acids by liquid chromatography on a Polyclar column and ultraviolet spectrophotometry

Phenolic acids of wide occurrence in plants have been separated by liquid chromatography on a Polyclar column. Experimental conditions leading to an optimal resolution have been defined (eluting solvents, elution gradient, flow rate, column length, and elution temperature). Each compound eluted from the adsorbant was automatically estimated quantitatively by a recording ultraviolet spectrophotometer: quantities as low as 0.1 μ mole could be detected.

The application of this method to the study of phenolic acids in plants and also to the separation of other phenolic compounds is discussed.

INTRODUCTION

La mise au point de méthodes de séparation et de dosage automatiques des acides aminés¹, des sucres^{2,3} et des acides organiques⁴, en permettant l'obtention d'un grand nombre de résultats, a largement contribué à la connaissance de ces métabolites chez les organismes vivants. Pour les composés phénoliques des végétaux, en revanche, alors que se développait l'analyse qualitative (Bate-Smith⁵, 1948), le domaine quantitatif n'était pas abordé.

En 1959, Swain et Hillis⁶, décrivaient une technique de dosage des phénols totaux, des flavonols, des leucoanthocyanes et des anthocyanes, mais l'étude individuelle de chaque composé phénolique n'était pas envisagée. El Basyouni et Towers⁷ puis plus récemment, Van Sumere *et al.*⁸, dosaient spectrophotométriquement les acides phénoliques après séparation par chromatographie sur papier bidimensionnelle ou sur couches minces ("multiple elimination thin-layer chromatography"). Seki *et al.*⁹ (séparation des acides phénoliques), Pictet et Brandenberger¹⁰ puis, Hanson et Zucker¹¹ (étude de l'acide chlorogénique) et Horhammer *et al.*¹² (pour les flavonoïdes et les antraquinones) préféraient la chromatographie sur colonne. Cette dernière technique, quoique plus adaptée aux études quantitatives, souffrait cependant de l'absence d'un adsorbant spécifique des composés phénoliques.

Le Polyclar AT (polyvinylpyrrolidone insoluble), utilisé pour la clarification de la bière et du vin^{13,14}, la purification des extraits végétaux¹⁵⁻¹⁷, la séparation des anthocyanes¹⁸⁻²⁰, et même la chromatographie sur couches minces²¹, pouvait présenter les qualités requises pour la chromatographie d'adsorption sur colonne des acides phénoliques. Dans la présente publication, les différents paramètres qui influencent la séparation des acides phénoliques sur colonne de Polyclar, sont étudiés. Le couplage de cette technique de séparation à la spectrophotométrie dans l'ultra violet a permis la mise au point d'une technique automatique de dosage des acides phénoliques les plus couramment rencontrés chez les végétaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

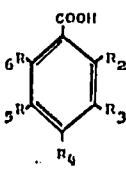
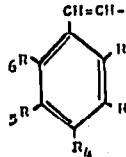
Les produits

Les différents acides phénoliques de référence, d'origine commerciale Merck, Fluka ou Schuchardt, ont été retenus en fonction de leur fréquence chez les végétaux²²⁻²⁵; le Tableau I donne la liste des composés utilisés et leur structure chimique.

Le Polyclar AT (General Anilin & Film Corp.) est purifié par action de l'acide chlorhydrique à 10% (1:5, p/v) pendant 10 min à ébullition sous reflux, puis lavé par l'eau distillée jusqu'à neutralité. On tamise alors la poudre de façon à ne retenir que les grains de diamètre compris entre 60 et 200 μm ; on lave abondamment par de l'eau fraîchement redistillée puis on déshydrate par l'acétone. Après évaporation

TABLEAU I

NATURE ET FORMULE CHIMIQUE DES ACIDES PHÉNOLIQUES ÉTUDIÉS

Formule	Série benzoïque					Acides
	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
	OH	OH	OH	OH		Benzoïque
		OH	OH			Salicylique
		OH	OH			<i>m</i> -Hydroxybenzoïque
		OH		OH		<i>p</i> -Hydroxybenzoïque
	OH	OH	OH			Protocatéchique
	OH					3,5-Dihydroxybenzoïque
	OH				OH	2,4-Dihydroxybenzoïque
	OH				OH	2,6-Dihydroxybenzoïque
		OH	OH	OH		Gentisique
		O-CH ₃	OH	OH		Gallique
		O-CH ₃	OH	O-CH ₃		Vanillique
			OH			Syringique
Formule	Série cinnamique					Acides
	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
	OH					Cinnamique
		OH				<i>o</i> -Coumarique
			OH			<i>m</i> -Coumarique
		OH	OH			<i>p</i> -Coumarique
		O-CH ₃	OH			Caféique
		O-CH ₃	OH			Férulique
			OH	O-CH ₃		Sinapique

du solvant, l'adsorbant est conservé en flacon coloré bouché (deux lots de Polyclar traité selon ce protocole ont présenté exactement les mêmes propriétés résolutive vis-à-vis des acides phénoliques). Avant utilisation, le Polyclar est mis à gonfler dans le solvant désiré pendant un quart d'heure, sous agitation lente. On laisse ensuite la poudre décanter puis on élimine le surnageant; cette opération répétée à trois reprises permet de se débarrasser des fragments provenant de l'éclatement des grains au cours du gonflement.

L'eau et l'éthanol absolu utilisés pour les séparations sont toujours redistillés avant l'emploi.

L'appareillage

Les colonnes, en verre, sont munies de jaquettes thermostatiques. De longueurs variables, elles présentent toutes un diamètre intérieur de 1 cm.

Un débit uniforme des solvants est assuré par une pompe péristaltique L.K.B. Perpex 1020.

La détection et le dosage des acides phénoliques sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DB (modifié pour l'analyse en flux continu), à trois longueurs d'ondes prédéterminées. L'enregistrement de l'absorption de l'effluent s'effectue à raison d'une mesure toutes les 20 sec pour chaque longueur d'onde et un déroulement du papier de 7.5 cm/h.

Étude des différents paramètres influençant la séparation des acides phénoliques

L'adsorption des acides phénoliques sur le Polyclar. Des études effectuées par divers auteurs^{15, 20, 27} montrent que l'adsorption des composés phénoliques sur Polyclar est optimale en milieu acide. Des éluants légèrement acidifiés par de l'acide sulfurique (0.05 M en concentration finale) ont donc toujours été utilisés de façon à donner aux phénomènes adsorption-désorption le rôle principal au cours des séparations.

Le choix des solvants et l'établissement d'un gradient d'éluant. Après divers essais préliminaires, l'éthanol et l'eau en mélange dans diverses proportions, ont été retenus;

TABLEAU II

VARIATION DES DISTANCES DE RÉTENTION DES ACIDES PHÉNOLIQUES EN FONCTION DE LA TENEUR EN ÉTHANOL DE L'ÉLUANT

Conditions d'analyse: colonne, 75 cm; température, 50°; débit 1 ml/min.

Acides (dans l'ordre de leur d_r croissant)		Radicaux		Mesure des distances de rétention (mm) en fonction des teneurs en éthanol (%) de l'éluant		
Séries	Acides	-OH	-O-CH ₃	80	50	30
Benzoïque	Syringique	1	2	198	231	376
	Vanillique	1	1	240	303	537
	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	1	0	302	410	795
	Protocatéchiq	2	0	645	772	1440
Cinnamique	Cinnamique	0	0	155	209	376
	Féruilique	1	1	252	355	704
	<i>p</i> -Coumarique	1	0	302	437	1010
	Catéique	2	0	624	815	1870

le Tableau II montre les variations des distances de rétention de plusieurs acides phénoliques, en fonction de la teneur en alcool de l'éluant.

L'examen de ce tableau permet de dégager certaines caractéristiques: (1) Dans chacune des deux séries, benzoïque ou cinnamique, l'ordre de sortie des acides est toujours identique et lié au nombre et à la nature des radicaux fixés sur le cycle. (2) La rétention augmente avec le nombre d'hydroxyles, les groupements méthoxylés provoquant, à l'inverse, une diminution des temps de rétention (ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en chromatographie sur papier²⁸).

Par ailleurs, si on étudie la variation des différences (Δ) entre les distances de rétention, on peut mettre en évidence deux types de phénomènes (Fig. 1): (1) Δ mesuré entre deux composés voisins augmente toujours lorsque le solvant devient plus aqueux, sauf dans le cas des acides cinnamique et syringique pour lesquels la séparation est plus importante en milieu éthanolique. (2) La valeur de Δ entre les composés homologues de chacune des deux séries (d_r des acides de la série cinnamique moins d_r des acides présentant le même degré de substitution dans la série benzoïque) décroît toujours quand la teneur en eau de l'éluant diminue (on peut même assister dans le cas des acides cinnamique-benzoïque et caféïque-protocatéchine à une inversion dans l'ordre de sortie des composés).

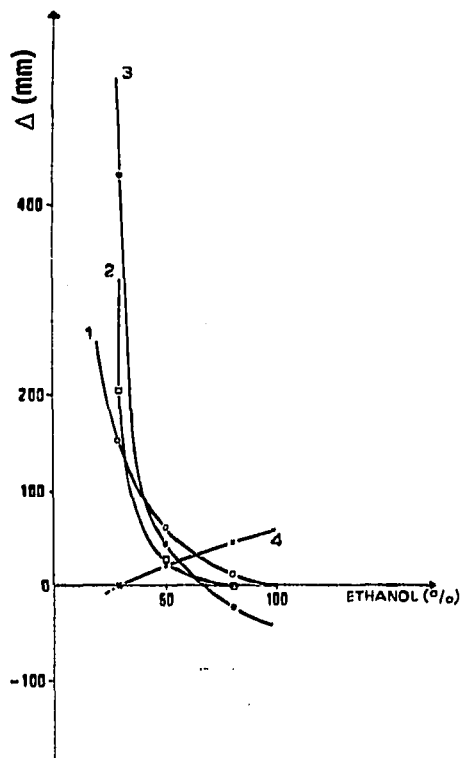


Fig. 1. Variation des différences (Δ) entre les distances de rétention de quatre couples d'acides phénoliques, en fonction de la teneur en éthanol de l'éluant (conditions d'analyse identiques à celles mentionnées dans le Tableau II). 1 = Férulique-vanillique; 2 = *p*-coumarique-*p*-hydroxybenzoïque; 3 = caféïque-protocatéchine; 4 = syringique-cinnamique.

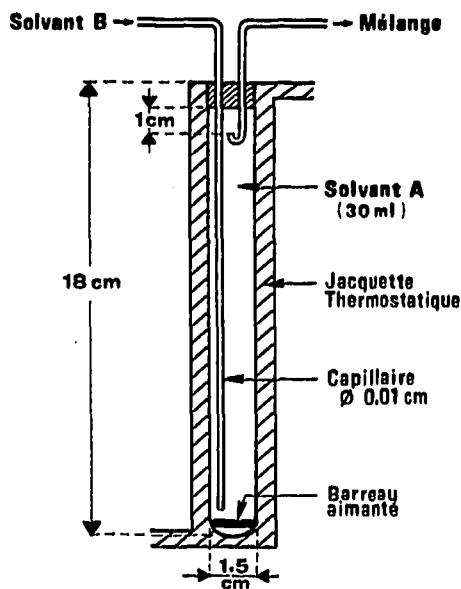


Fig. 2. Dispositif permettant de réaliser un gradient de concentration adapté à la séparation des acides phénoliques.

À la suite de ces observations, il apparaît que l'éluion des acides phénoliques par un mélange solvant de constitution constante est inadéquate.

Un gradient de concentration a été réalisé par l'utilisation d'un dispositif inspiré de Hulme et Woollorton²⁹ et représenté par la Fig. 2. Le corps de l'ampoule, d'un volume de 30 ml, contient le solvant A—éthanol-eau (65:35), H_2SO_4 0.05 M—dont la teneur élevée en éthanol permet la séparation des acides cinnamique et syringique; ce premier solvant est enrichi par un éluant plus aqueux—éthanol-eau (30:70), H_2SO_4 0.05 M— adapté à la séparation des autres acides phénoliques. La disposition particulière des capillaires d'arrivée et de départ ont pour but le stockage au sommet de l'ampoule de l'air dégagé au cours du mélange des deux solvants. La Fig. 3 donne l'allure du gradient de concentration obtenu à l'aide de ce dispositif.

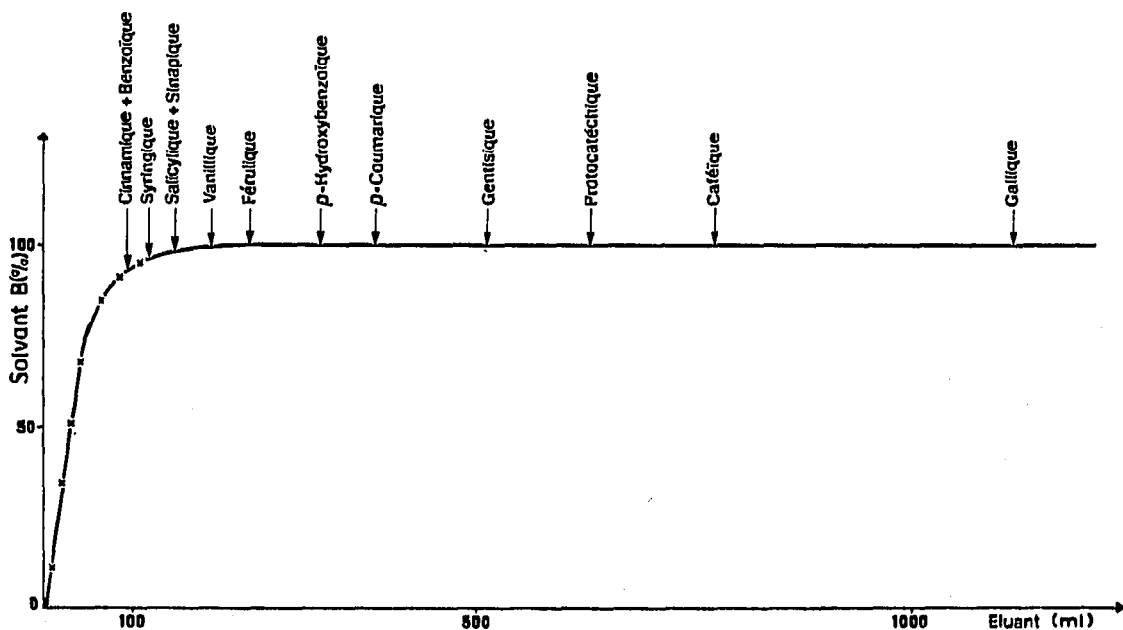


Fig. 3. Allure du gradient de concentration obtenu à l'aide du dispositif représenté par la Fig. 2.

La longueur de la colonne. La Fig. 4 montre l'évolution des distances de rétention pour différents acides phénoliques en fonction de la longueur de la colonne, toutes conditions restant égales par ailleurs. On peut noter (1) qu'il existe une longueur de colonne minimale pour laquelle aucune séparation n'est possible et (2) que la distance de rétention (donc du temps de l'analyse) croît avec la longueur de la colonne. On observe que la séparation entre les composés s'améliore mais est accompagnée d'un étalement des pics. Une colonne de 1×100 cm, représentant un compromis entre les différents paramètres énoncés précédemment, a été retenue dans le protocole définitif (le rapport $d:L = 1:100$ correspondant d'ailleurs à celui préconisé par Chovin³⁰ en chromatographie d'adsorption).

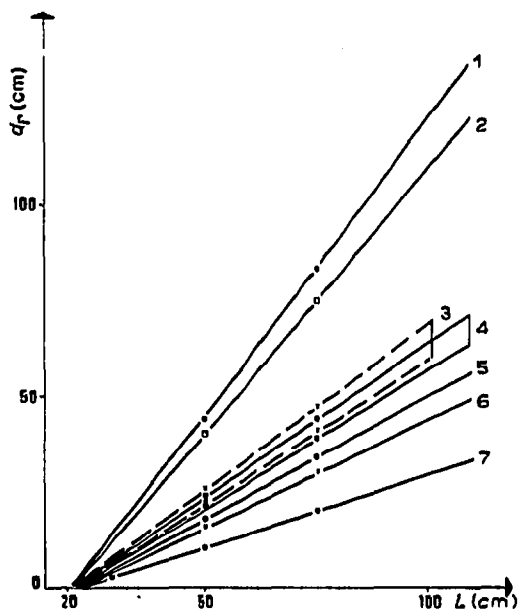


Fig. 4. Variation des distances de rétention et de la largeur des pics mesurée à la mi-hauteur (acides *p*-coumarique et *p*-hydroxybenzoïque), en fonction de la longueur de la colonne. 1 = Caféique; 2 = protocatéchique; 3 = *p*-coumarique; 4 = *p*-hydroxybenzoïque; 5 = férulique; 6 = vanillique; 7 = cinnamique.

La température de séparation et le débit du solvant d'élution. Après de nombreux essais préliminaires, ces paramètres ont été fixés respectivement à 60° et 1.08 ml/min, permettant une analyse dans un temps relativement court (20 h) et une pression à l'entrée de la colonne de l'ordre de 10 à 12 p.s.i.

Détection et dosage des acides phénoliques dans l'ultra violet (choix des longueurs d'ondes d'absorption)

Les acides phénoliques présentent des spectres d'absorption caractéristiques en lumière ultra violette; cette propriété a été exploitée en vue de l'évaluation des

TABLEAU III

LONGUEUR D'ONDE À LAQUELLE SERA APPRÉCIÉE L'ABSORPTION DE CHAQUE ACIDE PHÉNOLIQUE

λ (nm)		
235	265	320
Benzoïque	Cinnamique	<i>p</i> -Coumarique
Salicylique	<i>m</i> -Coumarique	<i>o</i> -Coumarique
Gentisique	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Caféique
<i>m</i> -Hydroxybenzoïque	Protocatéchique	Férulique
α -Résorcylique	β -Résorcylique	Sinapique
γ -Résorcylique	Gallique	
	Vanillique	
	Syringique	

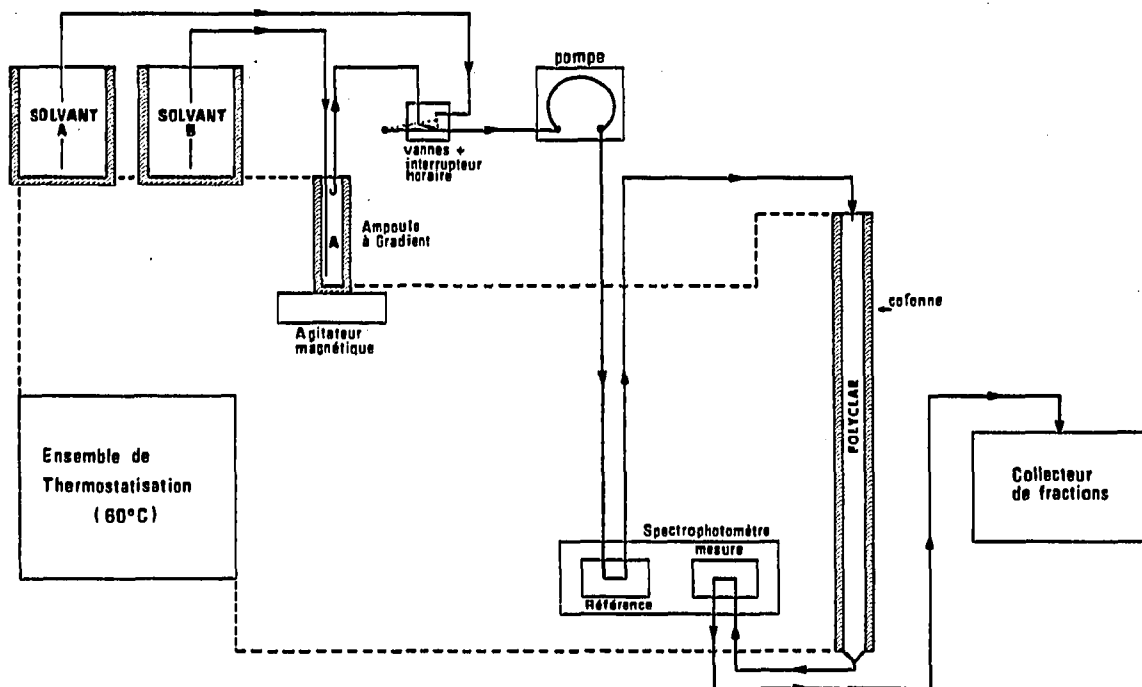


Fig. 5. Dispositif général utilisé pour la séparation et le dosage automatiques des acides phénoliques. - - -, Circuit du fluide thermostaté à 60°; ———, circuit du liquide d'éluant.

substances dans l'effluent; à la sortie de la colonne. Trois longueurs d'ondes ont été retenues: 235, 265 et 320 nm; le Tableau III indique à laquelle de ces valeurs sera appréciée la quantité de chaque acide phénolique présent dans l'éluant.

Description du montage, automatisation et protocole expérimental

La Fig. 5 représente le dispositif utilisé pour la séparation et le dosage automatiques des acides phénoliques et les différentes connexions entre les éléments.

La colonne, l'ampoule à gradient et les flacons contenant les solvants sont maintenus à 60° par un ensemble de thermostatisation. Avant utilisation, on porte les solvants A et B à 70° sous réfrigérant à reflux de façon à les désaérer puis on les transvase, chauds, dans leurs récipients respectifs. Le Polyclar, tassé dans la colonne sous une pression de 10 p.s.i. (correspondant à la pression maximum appliquée au cours de l'analyse), est mis à équilibrer pendant 12 h avec le solvant A au débit de 1.08 ml/min avant la première analyse.

Les acides phénoliques, en solution dans le premier solvant (1 ml maximum), sont déposés au sommet de la colonne et l'analyse se poursuit pendant 20 h. Un interrupteur horaire commandant un système de vannes permet d'admettre à ce moment le solvant A. Le Polyclar est régénéré pendant 4 h et l'ensemble de l'appareillage prêt pour une nouvelle analyse toutes les 24 h.

L'ensemble spectrophotomètre-enregistreur traduit sous forme de pics la sortie des acides phénoliques; la mesure de la surface des pics par triangulation donne la quantité de chaque acide phénol contenu dans l'extrait étudié.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La méthode mise au point permet de séparer et de doser automatiquement la plupart des acides phénoliques rencontrés chez les végétaux. La Fig. 6 représente l'éluotogramme obtenu pour douze des composés les plus fréquemment représentés²¹⁻²⁴.

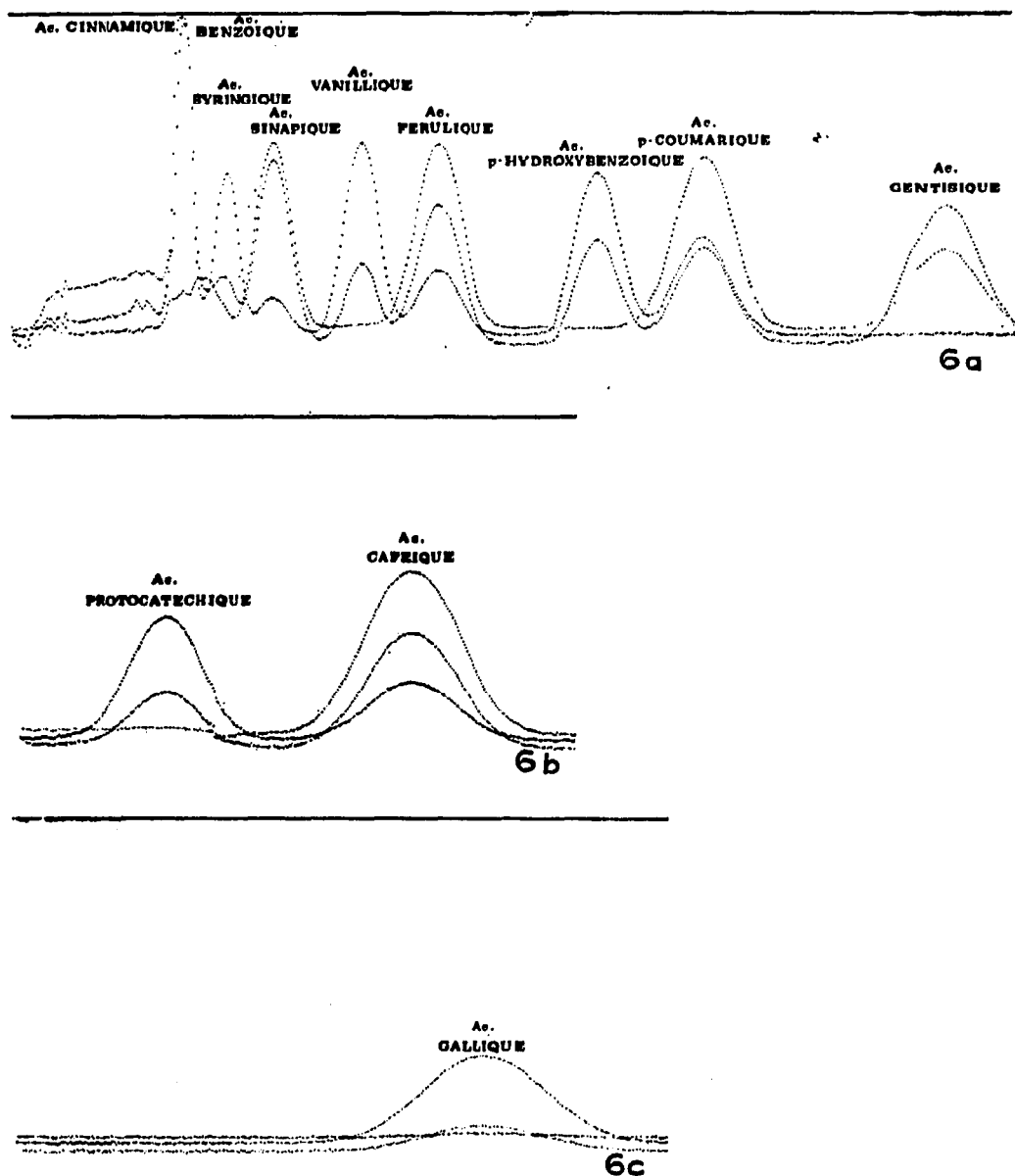


Fig. 6. Séparation des douze acides phénoliques les plus couramment rencontrés chez les végétaux, obtenue selon le protocole mis au point. Les trois tracés correspondent à la mesure de l'absorbance à 235, 265 et 320 nm.

Dans les conditions retenues la résolution est bonne pour la plupart des composés et seuls les acides cinnamique-benzoïque et sinapique-salicylique ne sont pas totalement séparés.

Du point de vue du dosage, les Fig. 7 et 8 représentent les courbes étalons tracées pour chaque acide et montrent que la proportionnalité entre la surface des pics et la quantité d'acide déposé sur la colonne peut être établie à partir de 0.1 à 0.2 μ mole selon les acides. L'utilisation d'un choix judicieux de longueurs d'ondes (Tableau III) permet, en outre, d'évaluer les teneurs en acides cinnamique et benzoïque. En effet, bien que ces deux substances ne soient pas séparées, leurs spectres ultra violets étant différents, il suffit de les doser respectivement à 265 et 235 nm. Dans ces conditions, l'erreur commise pour chacun d'eux est inférieure à $\pm 5\%$. Il n'en est pas de même pour les acides sinapique et salicylique dont les spectres ultra violets sont très semblables; l'étude des tracés à 235 et 265 nm permet cependant de déterminer facilement la présence simultanée ou non des deux composés dans l'extrait analysé (Fig. 9).

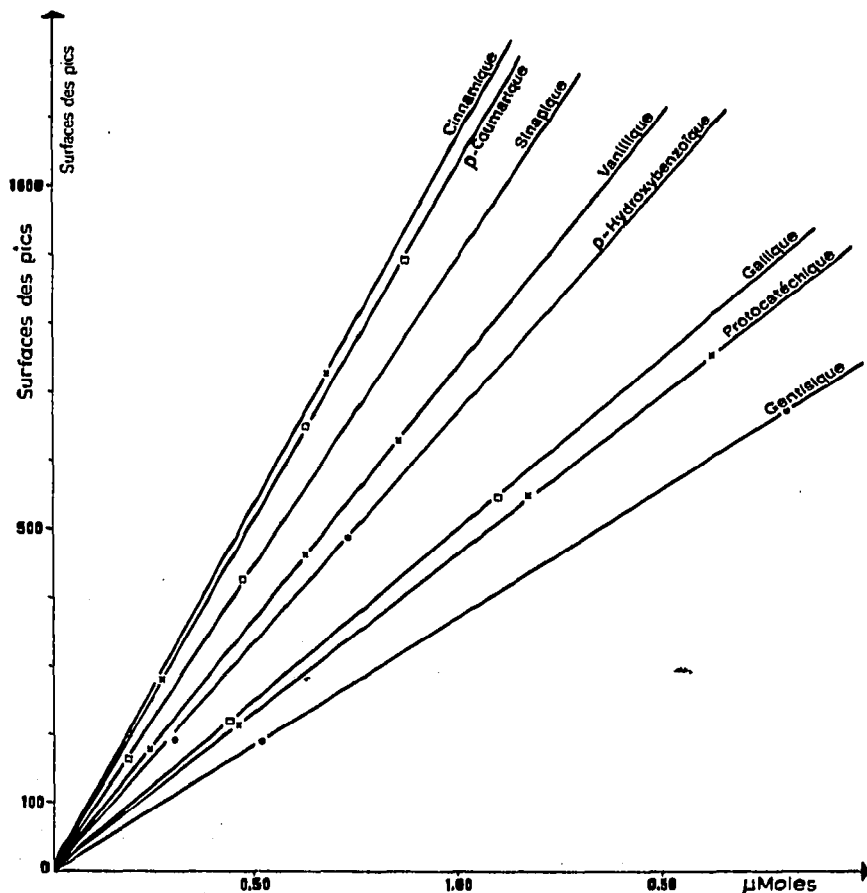


Fig. 7. Courbes étalons montrant la proportionnalité entre les surfaces mesurées sur l'élutogramme et le nombre de μ moles introduites sur la colonne pour huit acides phénoliques.

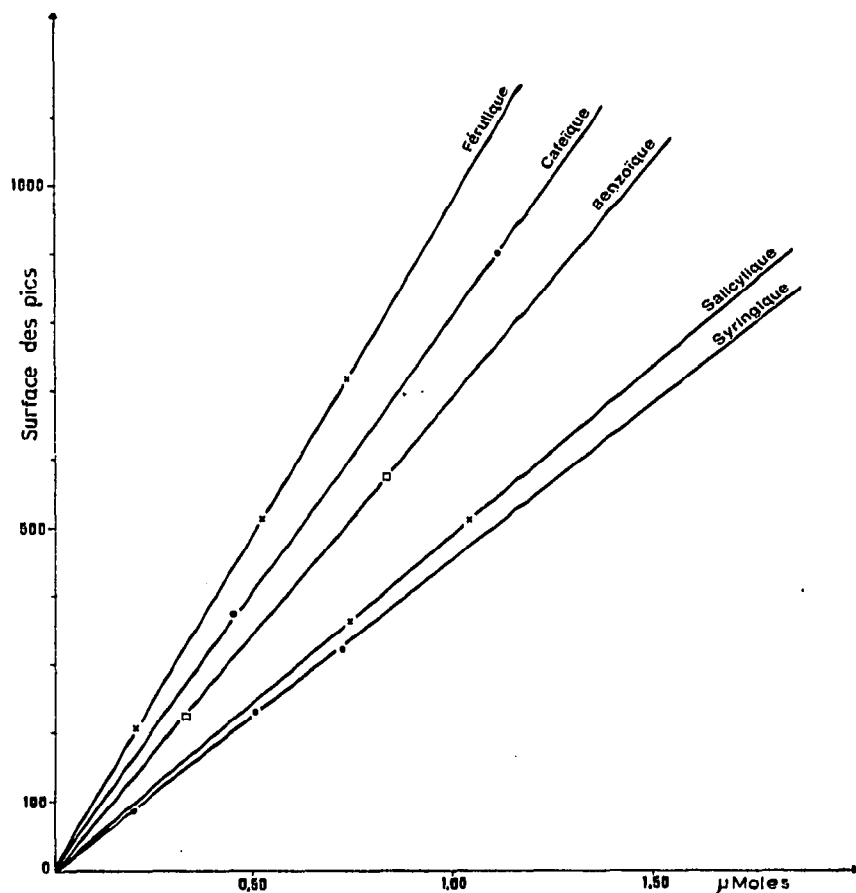


Fig. 8. Courbes étalons montrant la proportionnalité entre les surfaces mesurées sur l'éluotogramme et le nombre de μ moles introduites sur la colonne pour cinq autres acides phénoliques.

La Fig. 9 montre la séparation obtenue pour un mélange complexe de seize acides phénoliques et la Fig. 10 la position sur le diagramme de six acides phénoliques très rarement mis en évidence chez les végétaux (l'acide *o*-coumarique par exemple n'est cité que trois fois au cours des études de répartition chez les fougères et les Phanérogames entreprises respectivement par Bohm et Tryon²⁵ et Ibrahim et Towers²³, les acides 3,5- et 2,4-dihydroxybenzoïque identifiés une seule fois et les acides 2,6-dihydroxybenzoïque, *m*-hydroxybenzoïque et *m*-coumarique, jamais cités).

L'application intensive de cette technique de séparation et de dosage des acides phénoliques à l'étude de différents milieux biologiques devrait sans doute permettre dans un proche avenir de déterminer sans ambiguïté la nature, l'origine métabolique et le rôle physiologique de ces substances.

Par ailleurs, selon le même principe utilisé pour les acides phénoliques, mais par l'apport de modifications mineures (longueur de la colonne, allure du gradient d'éluion, choix des longueurs d'ondes) la séparation et le dosage automatiques d'autres substances phénoliques végétales (coumarines, flavonoïdes, anthocyanes) devraient pouvoir être envisagés.

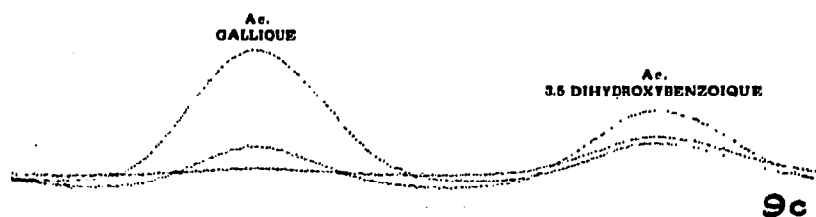
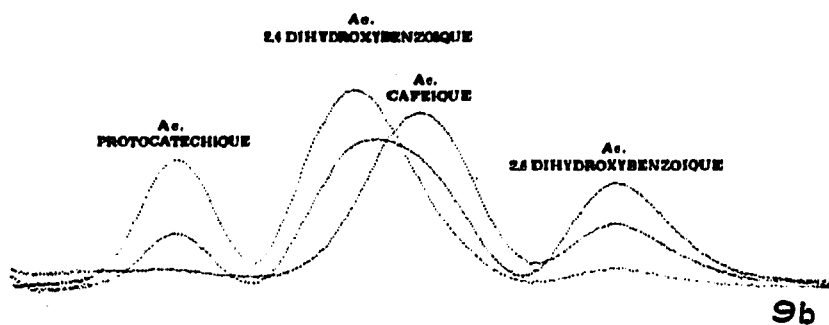
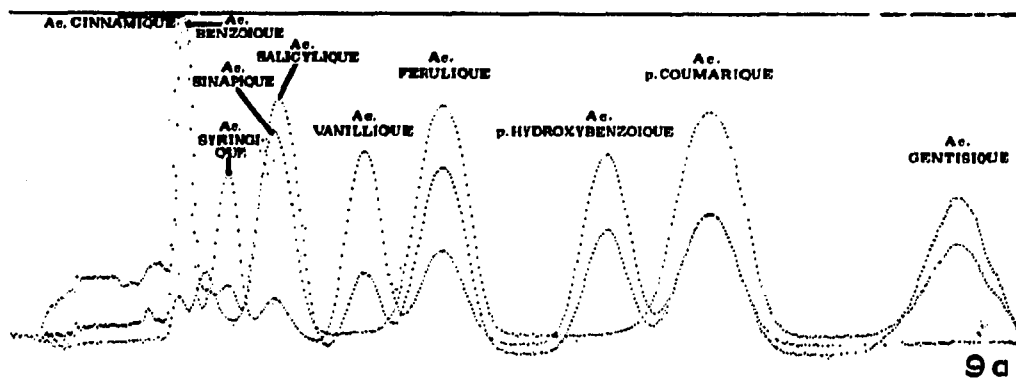


Fig. 9. Séparation de la plupart des acides des séries cinnamique et benzoïque.

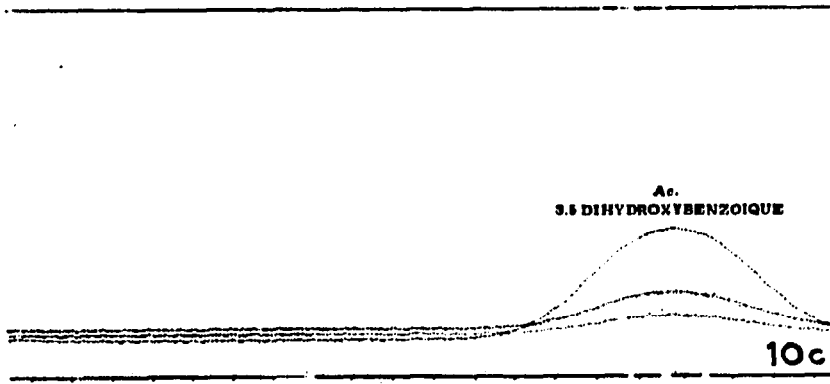
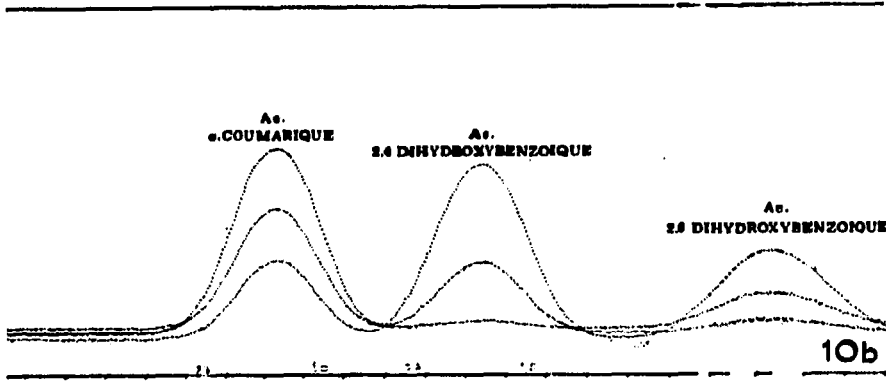
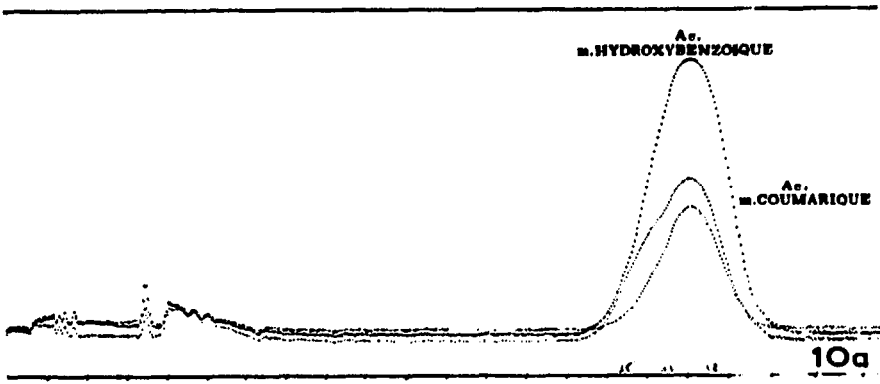


Fig. 10. Position sur l'élutogramme de six acides phénoliques rarement présents chez les végétaux.

RÉSUMÉ

Les acides phénoliques les plus couramment rencontrés chez les végétaux sont séparés par chromatographie en phase liquide sur colonne de Polyclar. Les conditions optimales de séparation (nature de l'éluant, gradient d'éluion, débit, longueur de la colonne et température d'éluion) sont étudiées. Le dosage automatique de chaque substance (dans une limite inférieure de 0.1 μ mole) est obtenu par l'analyse spectrophotométrique directe de l'effluent en sortie de colonne.

L'application de cette technique à l'étude des acides phénoliques végétaux et son extension éventuelle à la séparation d'autres composés phénoliques sont discutées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN ET S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1950) 1190.
- 2 R. B. KESSLER, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1416.
- 3 P. AURIOL ET A. TOUZÉ, *Physiol. Veg.*, 8 (1970) 263.
- 4 J. CARLES, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 1341.
- 5 E. C. BATE-SMITH, *Nature (London)*, 161 (1948) 835.
- 6 T. SWAIN ET W. E. HILLIS, *J. Sci. Food Agr.*, 10 (1959) 63.
- 7 EL BASYOUNI ET G. H. N. TOWERS, *Can. J. Biochem.*, 42 (1964) 203.
- 8 C. F. VAN SUMERE, J. COTTENIE, J. DE GREEF ET J. HINT, *Rec. Advan. Phytochem.*, 4 (1972) 165.
- 9 T. SEKI, K. INAMORI ET K. SANO, *J. Biochem. (Tokyo)*, 46 (1959) 1653.
- 10 G. PICTET ET H. BRANDENBERGER, *J. Chromatogr.*, 4 (1960) 396.
- 11 K. R. HANSON ET M. ZUCKER, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 1105.
- 12 L. HORHAMMER, H. WAGNER ET O. FÜCKING, *Arch. Pharm.*, 293 (1960) 1001.
- 13 W. D. MC FARLANE, *J. Inst. Brew.*, 67 (Vol. 58, New series) (1961) 502.
- 14 GENERAL ANILIN & FILM CORP., *Polyclar AT, a new clarifying and stabilizing agent for beer, wine and other beverages*, Technical Bulletin FO-64-2, 1963.
- 15 W. D. LOOMIS ET J. BATTAILE, *Phytochemistry*, 5 (1966) 423.
- 16 G. W. SANDERSON ET P. B. M. PERERA, *Analyst (London)*, 91 (1966) 335.
- 17 J. L. WILSON, W. J. DUNLAP ET S. H. WENDER, *J. Chromatogr.*, 35 (1968) 329.
- 18 G. HRAZDINA, *J. Agr. Food Chem.*, 18 (1970) 243.
- 19 C. G. VAN TEBLING, P. E. CANSFIELD ET R. A. GALLOP, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 505.
- 20 R. E. WROLSTAD ET B. J. STRUTHERS, *J. Chromatogr.*, 55 (1971) 405.
- 21 C. QUARMBY, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 52.
- 22 E. C. BATE-SMITH, *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 27 (1956) 165.
- 23 R. K. IBRAHIM ET G. H. N. TOWERS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 87 (1960) 125.
- 24 B. A. BOHM ET G. H. N. TOWERS, *Can. J. Bot.*, 40 (1962) 677.
- 25 B. A. BOHM ET R. M. TRYON, *Can. J. Bot.*, 45 (1967) 585.
- 26 R. A. ANDERSEN ET J. A. SOWERS, *Phytochemistry*, 7 (1968) 293.
- 27 G. MARIGO, *Analisis*, 2 (1973) 106.
- 28 W. STECK ET S. H. WENDER, *J. Chromatogr.*, 19 (1965) 564.
- 29 A. C. HULME ET L. S. C. WOOLTORTON, *J. Sci. Food Agr.*, 3 (1958) 150.
- 30 P. CHOVIN, *Chromatographie en Chimie Organique et Biologique*, Masson, Paris, 1959, p. 39.