

CHROM. 9249

Note

Séparation et dosage automatique des aldéhydes benzoïques et cinnamiques par chromatographie en phase liquide

GILBERT ALIBERT

Centre de Physiologie Végétale, Laboratoire Associé au C.N.R.S. No. 241, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31077 Toulouse Cédex (France)

et

JEAN-LOUIS PUECH

I.N.R.A., Laboratoire de Technologie Végétale, C.R.A. de Toulouse, Chemin de Borde Rouge, 31320 Auzeville (France)

(Reçu le 22 mars 1976)

Les aldéhydes aromatiques, de répartition générale chez les végétaux¹, ont rarement été identifiées à l'état libre².

Ces aldéhydes présentent un intérêt économique non négligeable: c'est le cas de la vanilline par exemple largement employée comme aromatisant. On les trouve également dans les eaux-de-vie conservées en fûts de chêne où elles participent au bouquet de ces alcools³⁻⁶.

Des aldéhydes phénoliques sont aussi obtenues après dégradation alcaline de la lignine^{7,8} et elles constituent une part importante des "liqueurs noires" rejetées par les industries papetières⁹. Dans ce secteur des recherches sont d'ailleurs entreprises pour aboutir à une meilleure connaissance de ces déchets afin de les contrôler et éventuellement de les valoriser.

Jusqu'à ce jour, les travaux analytiques effectués sur les aldéhydes aromatiques ont été surtout qualitatifs ou semi-quantitatifs: la chromatographie sur papier¹⁰, ou sur couches minces^{11,12} représentant les techniques les plus couramment utilisées.

D'un point de vue purement quantitatif, les aldéhydes aromatiques peuvent être séparées puis dosées par chromatographie en phase gazeuse¹³. Cependant, cette méthode particulièrement utilisée dans l'étude des produits de dégradation des lignines déjà purifiées^{14,15} n'apporte pas toujours les résultats escomptés dans l'analyse d'extraits complexes.

Enfin, en chromatographie en phase liquide, Bricout⁵ a obtenu des séparations convenables sur gel de silice. Un autre adsorbant, le Polyclar AT (polyvinylpyrrolidone condensé), déjà utilisé pour la clarification de la bière et du vin^{16,17}, peut servir de support pour la chromatographie sur colonne de divers types de composés phénoliques¹⁸⁻²⁰. Le couplage de la chromatographie en phase liquide sur colonne de Polyclar avec la spectrophotométrie nous a déjà permis de développer une méthode de séparation et de dosage automatique des acides phénoliques²¹; ce premier travail a maintenant été étendu aux aldéhydes des séries benzoïque et cinnamique.

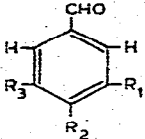
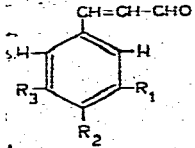
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les produits

Onze aldéhydes phénoliques des séries benzoïque et cinnamique ont été retenues en raison de leur présence fréquente chez les végétaux ou de leur participation au bouquet de diverses boissons alcoolisées. Leur formule chimique est donnée dans le Tableau I.

TABLEAU I

NOMENCLATURE DES ALDÉHYDES ETUDIÉES (SÉRIES BENZOÏQUE ET CINNAMIQUE)

Formule	R ₁	R ₂	R ₃	Aldéhyde
	H	H	H	Benzaldéhyde
	OH	H	H	<i>m</i> -Hydroxybenzaldéhyde
	H	OH	H	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde
	OH	OH	H	3,4-Dihydroxybenzaldéhyde
	H	O-CH ₃	H	Anisaldéhyde
	O-CH ₃	OH	H	Vanilline
	OH	O-CH ₃	H	Isovanilline
	O-CH ₃	OH	O-CH ₃	Syringaldéhyde
	H	H	H	Cinnamaldéhyde
	O-CH ₃	OH	H	Coniféraldéhyde
	O-CH ₃	OH	O-CH ₃	Sinapaldéhyde

Les produits de référence sont d'origine commerciale E. Merck (Darmstadt, R.F.A.) ou Fluka (Buchs, Suisse) sauf la coniféraldéhyde et la sinapaldéhyde (non commercialisées). Celles-ci ont été isolées d'eaux-de-vie vieilles en fût de chêne: après évaporation de l'alcool, la phase aqueuse amenée à pH 9 est épuisée par l'éther éthylique; les aldéhydes phénoliques sont ensuite purifiées par chromatographie préparative sur couches minces (plaques Schleicher et Schüll Dassel, R.F.A.; gel de silice F-1500) dans deux systèmes solvants:

(1), *n*-hexane-éther éthylique-dichlorométhane-acide acétique (4:3:1:2); (2) éther de pétrole-alcool isoamylique-acide formique (100:30:0.25).

Les valeurs R_F obtenues en chromatographie sur couches minces^{4,5,12} les colorations données par des révélateurs spécifiques^{4,12} et les spectres en lumière ultraviolette (UV) des composés isolés^{3,5,22,23} sont identiques à ceux fournis par divers auteurs. Ces deux aldéhydes ont, par ailleurs, été obtenues à l'état pur comme le montrent les spectres UV des deux substances en solution dans le méthanol (Fig. 1).

Le Polyclar AT (General Anilin & Film Corp.) est traité comme il a déjà été décrit précédemment²¹.

La technique de séparation et de dosage

L'appareillage. Le schéma de l'appareillage utilisé et les connections entre les différents éléments sont donnés dans la Fig. 2.

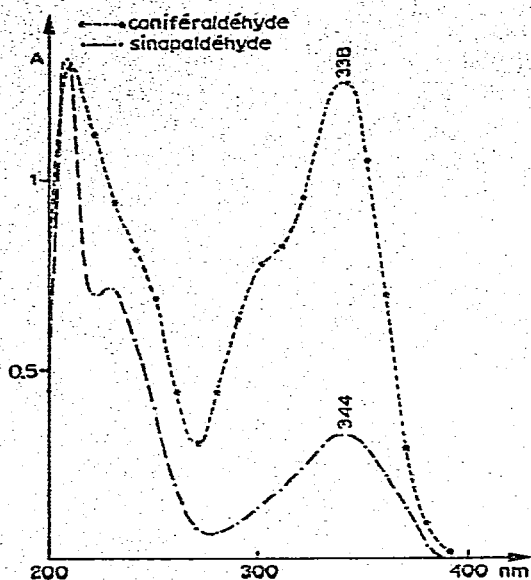


Fig. 1. Spectre en lumière UV de la coniféraldéhyde et de la sinapaldéhyde en solution dans le méthanol.

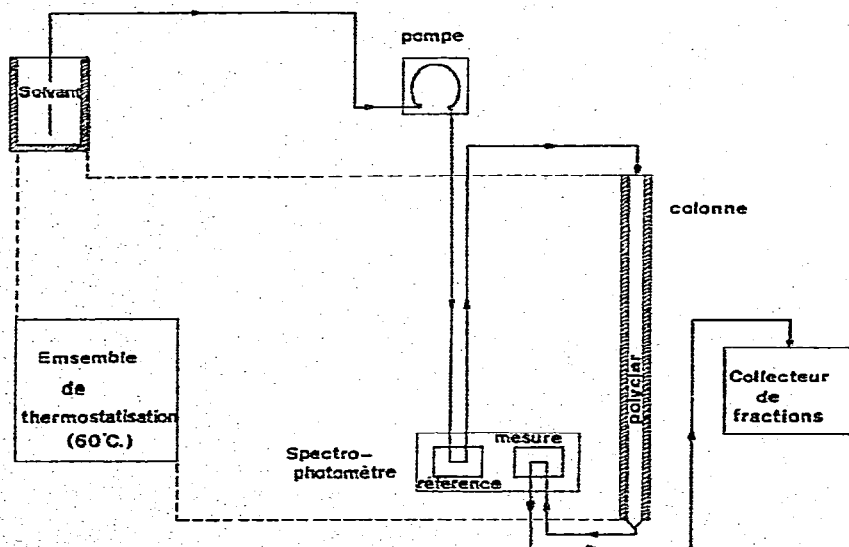


Fig. 2. Dispositif utilisé pour la séparation et le dosage automatique des aldéhydes phénoliques. ---, Circuit du fluide thermostaté à 60°; —, circuit des solvants.

La colonne en verre (100 × 1 cm) et le récipient contenant les solvants sont thermostatés à 60°. La détection et le dosage des substances sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DB (modifié pour l'analyse en flux continu) à trois longueurs d'ondes prédéterminées (Tableau II).

Enfin, un débit uniforme du solvant fixé à 1.08 ml/min est obtenu à l'aide d'une pompe péristaltique LKB Perpex 1020.

TABLEAU II
LONGUEURS D'ONDES (λ) RETENUES POUR LA DÉTECTION SPECTROPHOTOMETRIQUE DES ALDÉHYDES PHÉNOLIQUES

λ (nm)	Aldéhyde
260	Benzaldéhyde Anisaldéhyde Cinnamaldéhyde <i>m</i> -Hydroxybenzaldéhyde <i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde
310	Isovanilline Vanilline Syringaldéhyde 3,4-Dihydroxybenzaldéhyde
340	Conféraldéhyde Sinapaldéhyde

Les solvants. Deux solvants alcooliques sont utilisés: (A) le mélange éthanol-eau (65:35), acide sulfurique 0.05 *M*; il s'agit d'un "solvant de lavage" du Polyclar. (B) éthanol-eau (10:90), acide sulfurique 0.05 *M* qui est le "solvant d'élu-tion". Dans tous les cas, les solvants sont portés préalablement à 70° sous reflux avant utilisation et transvasés chauds dans le réservoir à solvant de l'appareil.

Le protocole expérimental

Préparation de la colonne. Le Polyclar en suspension dans le solvant A est introduit dans la colonne, puis tassé sous une pression de 12 p.s.i. La colonne est alors mise à équilibrer dans ce solvant (débit 1.08 ml/min) pendant 12 h. On remplace alors le solvant A par le solvant B et on poursuit l'équilibration pendant 5 h. Après cette période, la colonne de Polyclar ainsi obtenue est stable pendant plus de trois mois; un nettoyage de la colonne par le solvant A s'avère parfois nécessaire lorsque les extraits analysés sont peu purifiés.

Analyse. Le mélange d'aldéhydes à séparer est mis en solution dans le solvant A. On dépose généralement sur la colonne des volumes inférieurs à 2 ml (on fait pénétrer les substances dans le Polyclar sous une pression de 5 p.s.i.), puis la pompe est mise en marche.

Les aldéhydes éluées sont détectées par spectrophotométrie et enregistrées sous forme de pics dont la surface est proportionnelle à la quantité de chaque substance déposée sur la colonne.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le Tableau III indique les volumes d'élu-tion et les temps de rétention des aldéhydes phénoliques retenues dans ce travail. La Fig. 3 montre un exemple de séparation des aldéhydes les plus fréquemment rencontrés dans les extraits d'origine végétale.

Du point de vue du dosage la Fig. 4 donne les courbes étalons tracées pour quelques unes de ces aldéhydes: il y a proportionnalité entre la surface des pics me-

TABLEAU III

VOLUMES D'ÉLUTION ET TEMPS DE RÉTENTION DES ALDÉHYDES PHÉNOLIQUES

Pic (Fig. 3)	Aldéhyde	Volume d'éluion (ml)	Temps de rétention (min)
1	Benzaldéhyde	125	116
2	Anisaldéhyde	141	131
3	Cinnamaldéhyde	163	151
4	Syringaldéhyde	195	195
5	Isovanilline	228	211
6	Vanilline	231	214
7	Sinapaldéhyde	272	252
8	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	275	255
8'	<i>m</i> -Hydroxybenzaldéhyde	283	262
9	Coniféraldéhyde	335	310
10	3,4-Dihydroxybenzaldéhyde	472	437

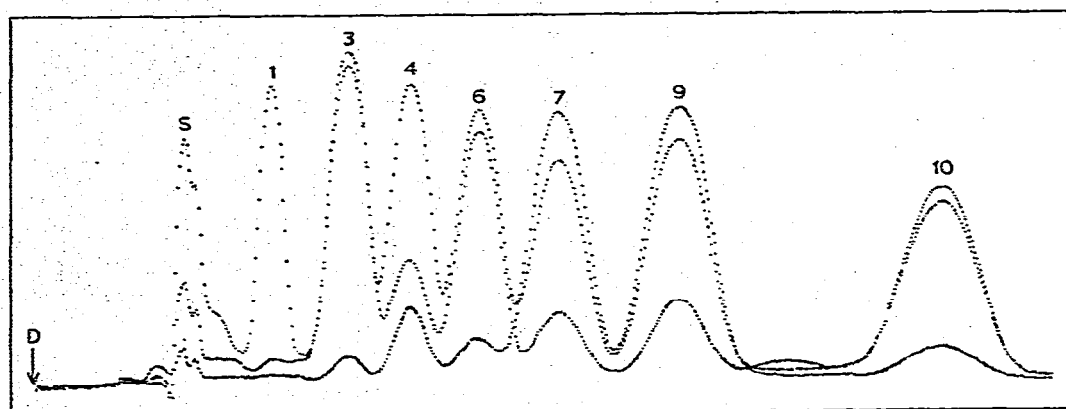


Fig. 3. Séparation des aldéhydes cinnamiques et benzoïques les plus couramment rencontrés dans les extraits d'origine végétale. Enregistrement de l'absorption, 1 mesure toutes les 20 sec; déroulement du papier de l'enregistreur, 7.5 cm/h; D = début de l'analyse; S = pic du solvant. Les numéros correspondent aux composés donnés dans le Tableau III.

surée et la quantité de substances déposées sur la colonne; la limite inférieure de sensibilité étant de 10 à 15 μg selon les composés.

La méthode décrite ici présente un certain nombre d'avantages par rapport aux techniques de séparation et de dosage des aldéhydes phénoliques utilisées à ce jour:

(1) Le pouvoir de résolution est très élevé et permet ainsi la séparation totale des aldéhydes benzoïques et cinnamiques.

(2) Les volumes d'éluion sont reproductibles.

(3) La détection en lumière UV simultanément à trois longueurs d'ondes est sélective: elle permet d'apprécier une contamination éventuelle par d'autres substances. De ce fait, la technique d'analyse proposée est supérieure à la chromatographie en phase gazeuse pour laquelle un couplage avec un spectromètre de masse s'avère parfois nécessaire.

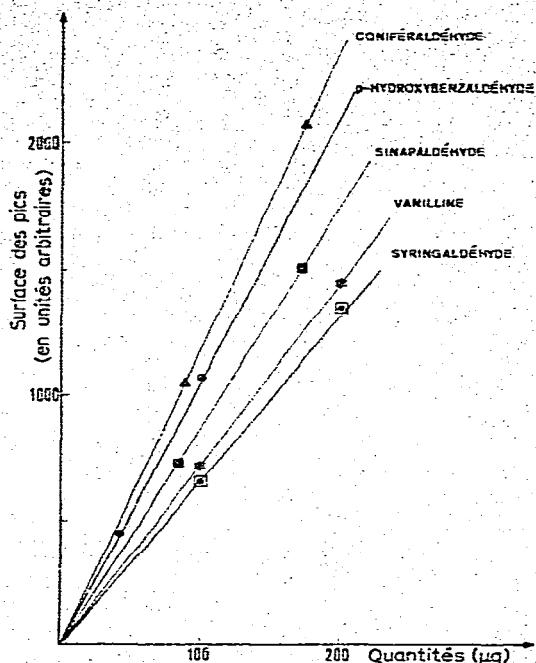


Fig. 4. Courbes étalons pour diverses aldéhydes phénoliques.

(4) Le temps relativement court (7 h) pour une analyse globale de la fraction aldéhydes phénoliques d'un extrait, et l'absence de régénération de la colonne (par l'utilisation d'un solvant unique) permettent de pratiquer de 2 à 3 analyses par 24 h. De ce fait, au cours d'étude de routine la méthode de séparation et de dosage apparaît rarement limitante.

(5) Enfin, la technique de mise au point permet de plus de récupérer les substances éluées sur collecteur de fractions et d'associer, si on le désire, au dosage spectrophotométrique une mesure directe de la radioactivité ("flow cell" d'un spectromètre à scintillation liquide). Ces caractéristiques rendent cette technique particulièrement bien adaptée aux études sur le métabolisme des lignines dont certaines aldéhydes sont à la fois des intermédiaires obligatoires et des produits de dégradation *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. B. Harborne et N. W. Simmonds, dans J. B. Harborne (Rédacteur), *Biochemistry of phenolic compounds*, Academic Press, London et New York, 1964, p. 77.
- 2 M. K. Seikel, dans J. B. Harborne (Rédacteur), *Biochemistry of phenolic compounds*, Academic Press, London et New York, 1964, p. 33.
- 3 S. Baldwin, R. A. Black, A. A. Andréasen et S. L. Adams, *J. Agr. Food Chem.*, 15 (1967) 381.
- 4 J. F. Guymon et E. A. Crowell, *Qual. Plant. Mater. Veg.*, 16 (1968) 320.
- 5 J. Bricout, *Ann. Technol. Agric.*, 20 (1971) 217.
- 6 I. M. Skourikhin et B. N. Efimov, dans *Bases biochimiques de la production du cognac* (en russe) 1972, p. 147.
- 7 I. A. Pearl, *TAPPI*, 41 (1958) 621.

- 8 K. Lundquist, *Sv. Papperstidn.*, 76 (1973) 704.
- 9 C. H. Hoyt et D. W. Goheen, dans K. V. Sarkanen et C. H. Ludwig (Rédacteurs), *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*, Wiley, 1971, p. 833.
- 10 J. E. Stone et M. J. Blundell, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 771.
- 11 J. M. Brand, *J. Chromatogr.*, 21 (1966) 424.
- 12 S. Gibbard et R. Schoental, *J. Chromatogr.*, 44 (1959) 396.
- 13 J. M. Pepper, M. Manolopoulos et R. Burton, *Can. J. Chem.*, 40 (1962) 1976.
- 14 J. M. Brand, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 373.
- 15 I. Kawamura et T. Higuchi, dans *Chimie et Biochimie de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses*, Imprimeries Réunies de Chambéry, Grenoble, 1964, p. 439.
- 16 W. D. McFarlane, *J. Inst. Brew.*, 67 (1961) 502.
- 17 *Polyclar AT, a new clarifying and stabilizing agent for beer, wine and other beverages*, Techn. Bull. FO-64-2, General Anilim & Film Corp., 1963.
- 18 G. Hrazdina, *J. Agr. Food Chem.*, 18 (1970) 243.
- 19 C. G. Von Teeling, P. E. Cansfield et R. A. Gallop, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 505.
- 20 L. Olsson et O. Samuelson, *J. Chromatogr.*, 93 (1974) 189.
- 21 G. Alibert, *J. Chromatogr.*, 80 (1973) 173.
- 22 R. A. Black, A. A. Rosen et S. L. Adams, *J. Amer. Chem. Soc.*, 75 (1953) 5344.
- 23 G. Aulin-Erdtman et R. Sandén, *Acta Chem. Scand.*, 22 (1968) 1187.