

CHROM. 15,648

## DOSAGE DES ACIDES ET ALDÉHYDES PHÉNOLIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE-PERFORMANCE: ANALYSE COMPARATIVE DES SOLS DE HAUTE MONTAGNE ET DE LEUR VÉGÉTATION

LÉON SERVE\*

*Laboratoire de Biologie Végétale, Université de Perpignan, Avenue de Villeneuve, F-66025 Perpignan Cédex (France)*

LOUIS PIOVETTI

*Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles Marines, Université de Perpignan, Avenue de Villeneuve, F-66025 Perpignan Cédex (France)*

et

NICOLE LONGUEMARD

*Groupement de Mesures Physiques pour la Chimie, Université de Perpignan, Avenue de Villeneuve, F-66025 Perpignan Cédex (France)*

(Reçu le 24 décembre 1982)

---

### SUMMARY

*Analysis of phenolic acids and aldehydes by high-performance liquid chromatography: a comparative analysis of high mountain soils and their vegetation.*

A method is described for the analysis of phenolic acids and aldehydes by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a ternary isocratic elution system. It is applied to the separation and the estimation of phenolic compounds issued from: (1) pyrenean soils at high altitude (Pyrénées-Orientales, France, 2500 m), and (2) the main plant growing there. Phenolic extracts of soil and plant are isolated exactly in the same way by the procedure described.

---

### INTRODUCTION

Les composés phénoliques sont largement répandus dans les végétaux où ils sont souvent combinés à des sucres sous forme de glycosides ou d'esters<sup>1,2</sup>. Certains d'entre eux, tels les acides hydroxybenzoïques, hydroxycinnamiques et les aldéhydes correspondants se trouvent également dans les sols où ils résultent de la décomposition de la matière organique<sup>3,4</sup>. La facilité avec laquelle ils s'oxydent leur conférerait un rôle important dans les processus physiologiques qui entraînent l'inhibition de la germination des semences de nombreuses espèces<sup>4</sup>.

Nous nous sommes intéressés au dosage de ces substances dans le cadre de notre étude phyto-écologique de l'étage alpin des Pyrénées-Orientales (France) pour laquelle nous comparons les rankers rencontrés sous la mosaïque du tapis végétal<sup>5,6</sup>.

Si l'on excepte la famille des Ericacées, très peu de végétaux de haute altitude ont fait l'objet d'analyses chimiques<sup>7-9</sup>. Nous avons alors été amenés à envisager une analyse simultanée du sol et de la plante qui le recouvre avec un très haut coefficient d'abondance-dominance. Le but était double: déterminer les caractères spécifiques de chaque taxon et comparer l'évolution de la matière organique de sols à écologie différente.

Les avantages de la chromatographie liquide haute-performance (CLHP) sur la chromatographie gaz-liquide (CGL) et les autres techniques de chromatographie ne sont plus à démontrer en ce qui concerne la rapidité et la sensibilité de la méthode pour la séparation et le dosage des composés phénoliques dans les extraits de plantes<sup>10-15</sup>.

La matière organique des sols, ainsi que les parois cellulaires des végétaux ont fait également l'objet d'une étude par CLHP<sup>16</sup>.

Toutefois l'utilisation des techniques actuellement décrites ne nous ayant pas conduit à des résultats satisfaisants dans notre domaine de recherche, nous proposons une méthode simple et reproductible de dosage des acides et aldéhydes phénoliques par CLHP, s'appliquant à l'analyse des sols et de leur végétation.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### *Appareil*

Ce travail est effectué sur un chromatographe liquide Waters Assoc. comprenant: une pompe modèle 6000 A délivrant des débits de 0.1 à 9.9 ml/min par intervalles de 0.1 ml/min et supportant des pressions de 100 à 6000 p.s.i.; un injecteur universel modèle U6K qui permet l'injection de volumes allant de 1  $\mu$ l à 2 ml, sans interruption de débit jusqu'à une pression limite de 6000 p.s.i.; un détecteur UV modèle 450 à longueur d'onde variable de 190 à 700 nm, réglé à 275 nm, avec un domaine de sensibilité de 0.01 à 2 unités d'absorbance et possédant une cellule de 8  $\mu$ l; un enregistreur linéaire Omniscrite série B 5000 à 10 mV pleine échelle.

Pour les séparations chromatographiques, deux colonnes identiques sont utilisées en série. Il s'agit de colonnes en acier inoxydable, 250  $\times$  4 mm, remplies de LiChrosorb RP-18 de granulométrie moyenne 7  $\mu$ m (E. Merck, Darmstadt, Allemagne Fédérale).

### *Solvants*

Trois solvants sont utilisés en mélange ternaire: eau, acétonitrile et acide acétique. Les deux solvants organiques sont des produits Merck p.a. (E. Merck, Darmstadt, Allemagne Fédérale). L'eau est fraîchement distillée et filtrée sur filtre PVC Sartorius de 0.45  $\mu$ m. Tous les solvants sont filtrés sur verre fritté de porosité 4 et dégazés sous vide juste avant leur emploi.

### *Echantillons standards*

Les acides et aldéhydes phénoliques de référence sont des produits commerciaux: acides *p*-hydroxybenzoïque, syringique, vanillique, coumarique, férulique, caféique, sinapique, *p*-anisique et aldéhydes syringique, *p*-hydroxybenzoïque (Aldrich-Europe, Belgique); acide protocatéchique (Fluka, Suisse); vanilline et acide benzoïque (E. Merck). Les acides hydroxycinnamiques: coumarique, férulique, sinapique et caféique se trouvent sous les deux formes isomères *cis*, *trans*.

*Isolement des composés phénoliques dans le sol et dans le végétal*

La méthode d'isolement choisie s'applique à la fois au sol et au végétal (ensemble des feuilles, tiges et racines). Elle s'inspire de la technique décrite par Hartley et Buchan<sup>16</sup> à laquelle nous apportons une modification avec l'extraction à l'acétate d'éthyle. Ce procédé permet d'améliorer nettement l'analyse en CLHP par l'élimination de nombreuses substances organiques qui perturbent les chromatogrammes.

5 g de sol (sec et broyé) ou 500 mg de végétal (sec et broyé) sont versés dans 50 ml d'hydroxyde de sodium 1 *N*. On agite 20 h sous azote, à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé (1000 g) et filtré sur papier Whatman No. 1. Le culot de centrifugation est lavé avec 50 ml d'eau distillée.

Une fraction aliquote de 50 ml est extraite à l'acétate d'éthyle (3 × 100 ml). La phase aqueuse est acidifiée à pH 1 avec l'acide chlorhydrique 6 *N*, laissée une nuit au repos, puis centrifugée (2500 g) de façon à séparer les acides humiques (sols) ou les acides humiques "néoformés" (végétal). Le culot de centrifugation est lavé avec de l'eau acidifiée à pH 1; les eaux de lavage sont ajoutées au surnageant précédent. La solution obtenue est extraite à l'acétate d'éthyle (3 × 60 ml). La phase organique est refroidie à -40°C pour éliminer l'eau, séchée sur sulfate de magnésium anhydre, puis évaporée.

*Préparation des solutions pour l'analyse en CLHP*

Les mélanges de référence sont effectués à partir des solutions-mères de chaque échantillon standard (0.60 g/l dans le méthanol) de telle sorte que les concentrations soient de l'ordre de 60 mg/l. L'étalonnage des constituants du mélange se fait par rapport à l'acide *p*-anisique utilisé comme étalon interne (solution-mère à 0.51 g/l dans le méthanol): on mélange 5 ml d'acide *p*-anisique à des volumes variables de chaque standard et on complète à 50 ml dans une fiole jaugée.

L'extrait à l'acétate d'éthyle du sol ou du végétal est préalablement dissous dans 2 ml de méthanol. On prélève 1 ml, auquel on ajoute 1 ml d'éluant CLHP et 0.2 ml de solution-mère d'acide *p*-anisique. La solution obtenue est injectée directement en CLHP.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons mis au point la technique de séparation sur deux mélanges de référence: (a) acides protocatéchique, *p*-hydroxybenzoïque, syringique, vanillique, coumarique, férulique, benzoïque et aldéhydes *p*-hydroxybenzoïque, vanilline; (b) acides caféique, sinapique et syringaldéhyde. L'acide *p*-anisique est ajouté à chacun de ces mélanges comme étalon interne.

Ce travail de séparation a été effectué par chromatographie liquide en phase inverse sur LiChrosorb RP-18, avec un système d'élution isocratique polaire. Dans ces conditions d'analyse, les mélanges ternaires décrits pour le dosage des composés phénoliques dans les sols: eau-*n*-butanol-acide acétique<sup>16</sup> ou dans les végétaux: eau-méthanol-acide acétique<sup>15</sup> n'ont pas permis une bonne résolution des pics dans les chromatogrammes de (a) et (b). Nous l'expliquons par le fait que les alcools utilisés augmentent la viscosité de l'éluant —la viscosité du *n*-butanol à 20°C est de 2.95 cP, celle du méthanol de 0.60 cP— ce qui diminue l'efficacité de la colonne en réduisant le coefficient de diffusion des composés ainsi que sa perméabilité<sup>17-19</sup>.

Afin d'améliorer la résolution des composés étudiés, nous avons utilisé l'acétonitrile à la place des alcools précédents<sup>14</sup>. Ce solvant est miscible à l'eau en toutes proportions et sa viscosité de 0.37 cP à 20°C est bien inférieure à celles du *n*-butanol et du méthanol. Après de multiples essais préliminaires nous avons choisi le mélange ternaire: eau-acétonitrile-acide acétique (84:14:2) qui permet la meilleure séparation dans nos conditions d'analyse (Tableau I et Figs. 1 et 2).

Cet éluant conduit à une résolution satisfaisante des acides et aldéhydes phénoliques présents dans les mélanges (a) et (b). Toutefois, il ne nous a pas été possible de séparer, en système isocratique, l'acide vanillique de l'acide syringique. Précisons également que la présence de l'acide acétique est nécessaire dans la phase mobile pour diminuer la trainée des pics<sup>14,20</sup>.

Dans l'optique d'une utilisation de cette technique pour l'analyse quantitative des substances phénoliques, nous avons étalonné les composés de référence par rapport à l'acide *p*-anisique (Figs. 3 et 4). L'isomérisation des acides hydroxycinnamiques sous l'action de la lumière évoluant rapidement en cours de dosage, nous les avons étalonnés dans leur ensemble (formes *cis* et *trans* réunies).

Les extraits phénoliques des sols et des végétaux ont été obtenus de façon rigoureusement identique par traitement à l'hydroxyde de sodium suivi d'une extraction à l'acétate d'éthyle, de l'acidification de la phase aqueuse et d'une deuxième extraction à l'acétate d'éthyle de la fraction acidosoluble. L'application de notre méthode CLHP à ces extraits est illustrée par les Figs. 5 et 6 et les Tableaux II et III.

Grâce à la technique d'extraction utilisée pour l'obtention de la fraction phénolique, la méthode de dosage décrite dans cet article apparaît comme parfaitement applicable à l'analyse des acides et aldéhydes phénoliques contenus dans les sols et

TABLEAU I

## TEMPS DE RÉTENTION DES ACIDES ET ALDÉHYDES PHÉNOLIQUES DE RÉFÉRENCE

Colonne: phase inverse RP-18 éluee par le mélange eau-acétonitrile-acide acétique (84:14:2), avec un débit de 1.5 ml/min.

No.	Composés	Temps de rétention (min)
1	Acide protocatéchique	5.90
2	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	9.38
3	Acide <i>trans</i> -caféique	10.36
4	Acide syringique	10.89
5	Acide vanillique	11.60
6	Acide <i>cis</i> -caféique	11.60
7	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	13.85
8	Vanilline	17.30
9	Syringaldéhyde	18.83
10	Acide <i>trans</i> -coumarique	19.50
11	Acide <i>cis</i> -coumarique	21.06
12	Acide <i>trans</i> -fêrulique	24.48
13	Acide <i>trans</i> -sinapique	24.80
14	Acide <i>cis</i> -fêrulique	26.78
15	Acide <i>cis</i> -sinapique	27.95
16	Acide benzoïque	33.85
17	Acide <i>p</i> -anisique	47.26

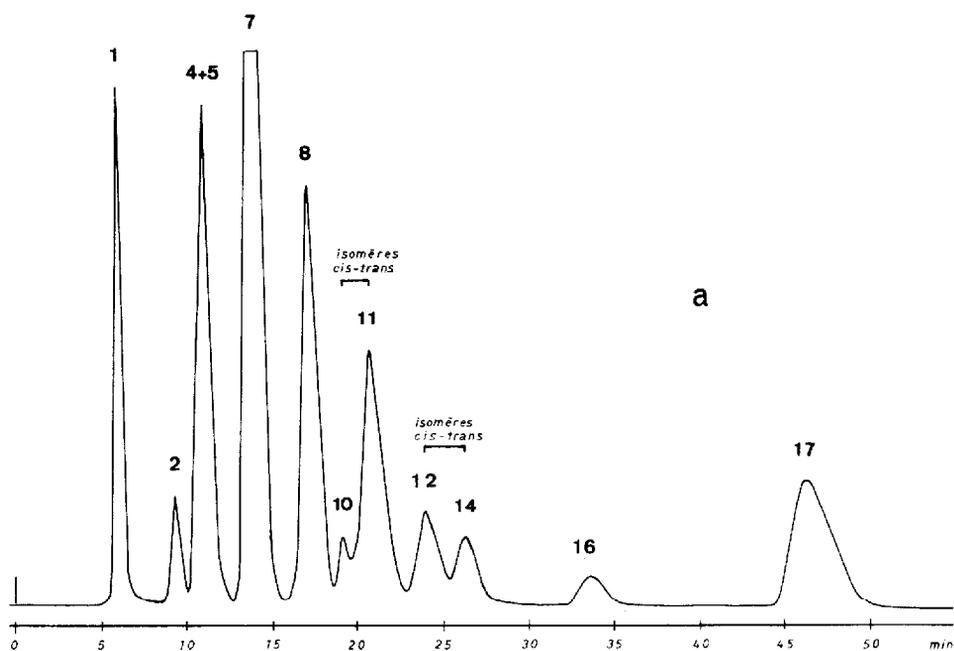


Fig. 1. Chromatogramme du mélange de référence (a). Phase mobile: eau-acétonitrile-acide acétique (84:14:2); phase stationnaire: LiChrosorb RP-18; débit: 1.5 ml/min; détecteur: spectrophotomètre UV, 275 nm. Les numéros correspondent aux composés donnés dans le Tableau I.

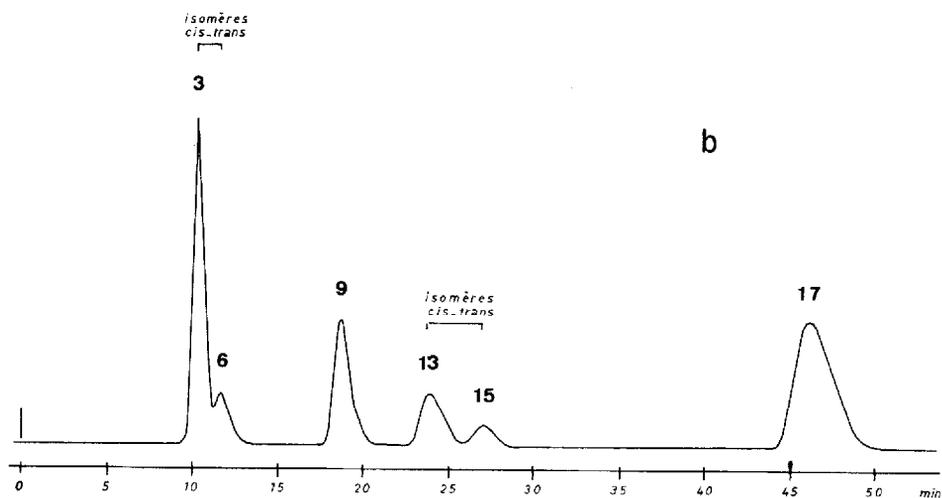


Fig. 2. Chromatogramme du mélange de référence (b). Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 1. Les numéros correspondent aux composés donnés dans le Tableau I.

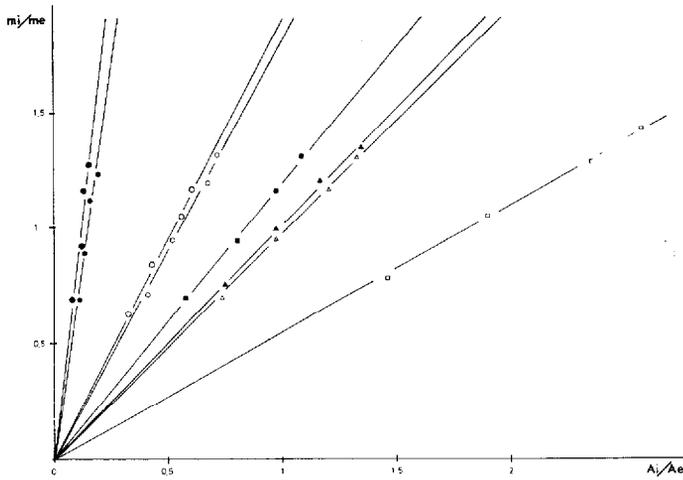


Fig. 3. Courbes d'étalonnage des acides et aldéhydes phénoliques du mélange (a), par référence à l'acide *p*-anisique (étalon interne);  $m_i/m_e$  = rapports des masses échantillon sur étalon interne;  $A_i/A_e$  = rapport des aires échantillon sur étalon interne; (●) acide benzoïque; (●) acide *p*-hydroxybenzoïque; (○) acide protocatéchuïque; (○) acide férulique; (■) acide coumarique; (▲) acides syringique et vanillique; (△) vanilline; (□) *p*-hydroxybenzaldéhyde.

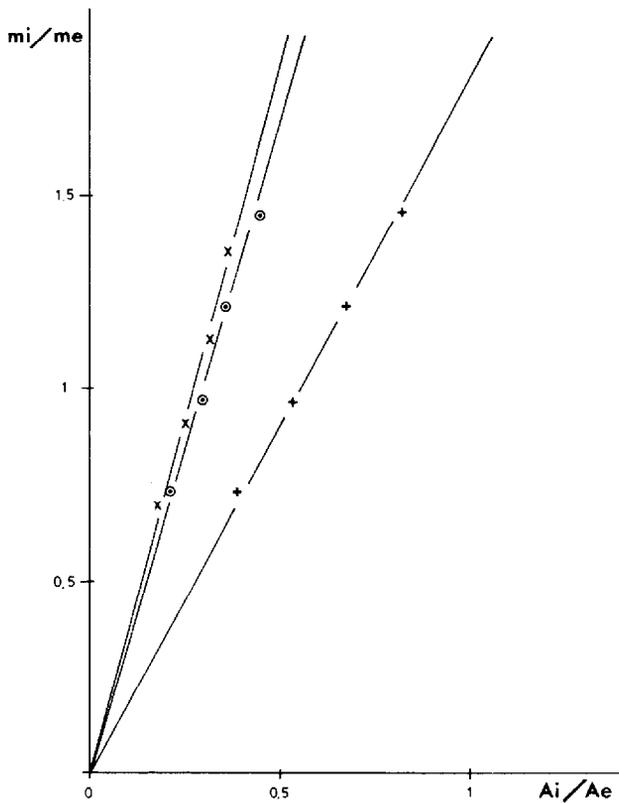


Fig. 4. Courbes d'étalonnage des acides et aldéhydes phénoliques du mélange (b) par référence à l'acide *p*-anisique; (×) acide sinapique; (⊙) syringaldéhyde; (+) acide caféique.

TABLEAU II

## COMPOSITION DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES DE QUELQUES SOLS DE HAUTE ALTITUDE PYRÉNÉENS

(c): Sol à *Loiseleuria procumbens* Desf.; (d): sol à *Trifolium alpinum* L.; (e): sol à *Festuca supina* Schurr. Les analyses sont effectuées au minimum deux fois sur le même échantillon.

No.	Composés	Temps de rétention (min)	Quantité (µg/g sol sec)		
			c	d	e
2	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	9.38	406.20	362.26	344.82
4	Acide syringique	10.89	16.72	22.54	15.68
5	Acide vanillique				
7	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	13.85	6.22	3.62	2.36
8'	Non identifié*	15.55	> 5,40	—	—
8	Vanilline	17.30	6.70	6.04	5.48
10	Acide <i>trans</i> -coumarique	19.50			
11	Acide <i>cis</i> -coumarique	21.06	31.06	108.68	94.04
12	Acide <i>trans</i> -fêrulique	24.48			
14	Acide <i>cis</i> -fêrulique	26.78	41.08	14.50	18.80
16	Acide benzoïque	33.85	119.48	120.76	94.04

\* Son temps de rétention se situe entre ceux du *p*-hydroxybenzaldéhyde et de la vanilline.

TABLEAU III

## COMPOSITION DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES DE QUELQUES VÉGÉTAUX DE HAUTE ALTITUDE PYRÉNÉENS

(c'): *Loiseleuria procumbens* Desf.; (d'): *Trifolium alpinum* L.; (e'): *Festuca supina* Schurr. Les analyses sont effectuées au minimum deux fois sur le même échantillon.

No.	Composés	Temps de rétention (min)	Quantité (mg/g végétal sec)		
			c'	d'	e'
1	Acide protocatéchique	5.90	0.922	0.008	—
2	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	9.38	3.516	1.180	0.852
4	Acide syringique	10.89	0.058	0.170	0.210
5	Acide vanillique				
7	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	13.85	0.014	0.004	0.024
8'	Non identifié*	15.55	> 0.800	—	—
8	Vanilline	17.30	—	0.008	0.086
10	Acide <i>trans</i> -coumarique	19.50			
11	Acide <i>cis</i> -coumarique	21.06	0.528	0.290	5.224
12	Acide <i>trans</i> -fêrulique	24.48			
14	Acide <i>cis</i> -fêrulique	26.78	0.484	0.230	0.690
16	Acide benzoïque	33.85	1.010	1.008	1.050

\* Son temps de rétention se situe entre ceux du *p*-hydroxybenzaldéhyde et de la vanilline.

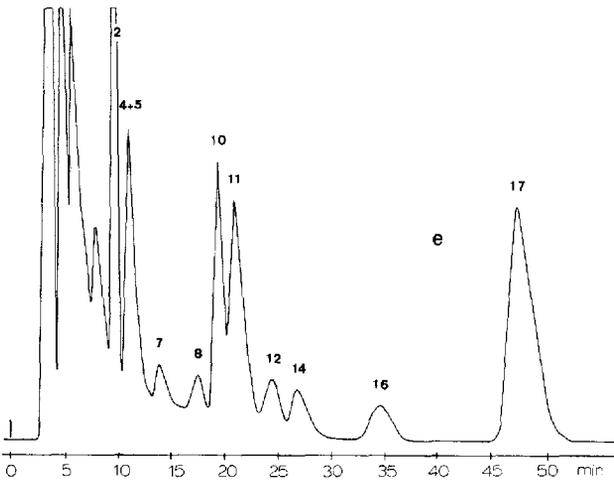
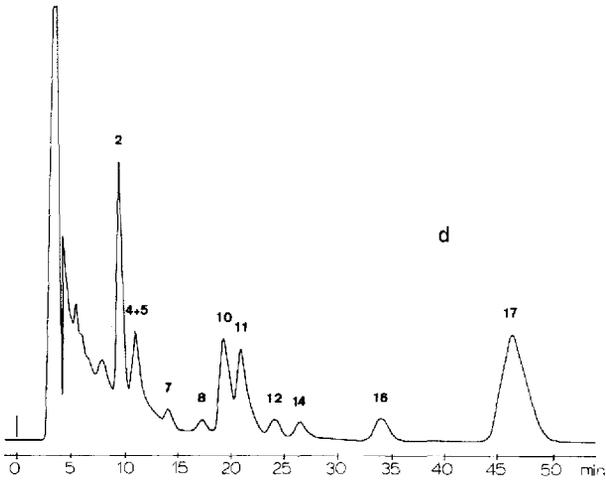
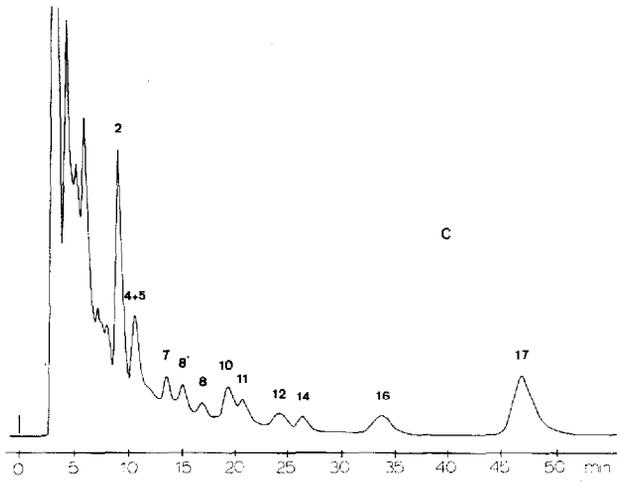


Fig. 5. Quelques exemples d'analyse de sols: (c), sol à *Loiseleuria procumbens* Desf. (Ericaceae); (d), sol à *Trifolium alpinum* L. (Papilionaceae); (e), sol à *Festuca supina* Schurr. (Gramineae). Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 1; acide *p*-anisique, étalon interne.

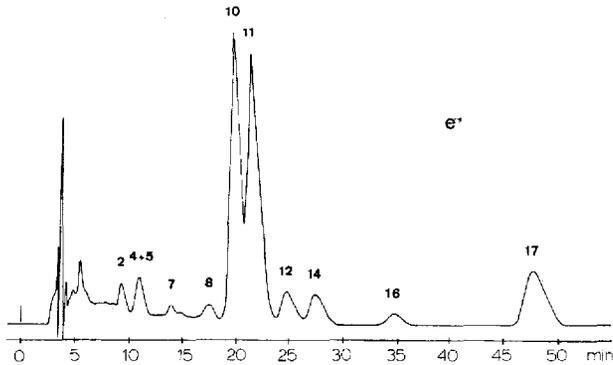
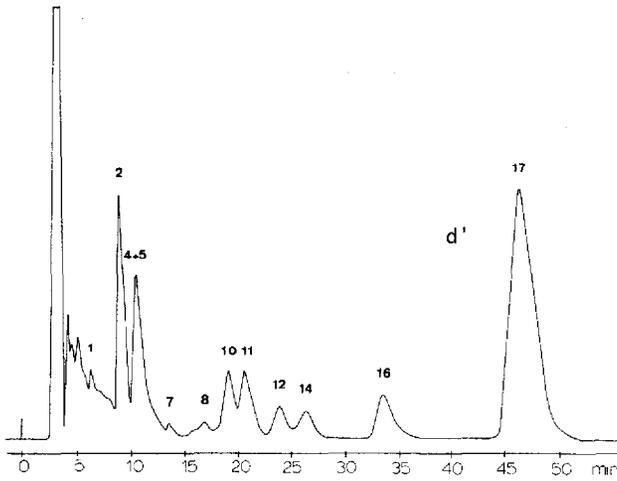
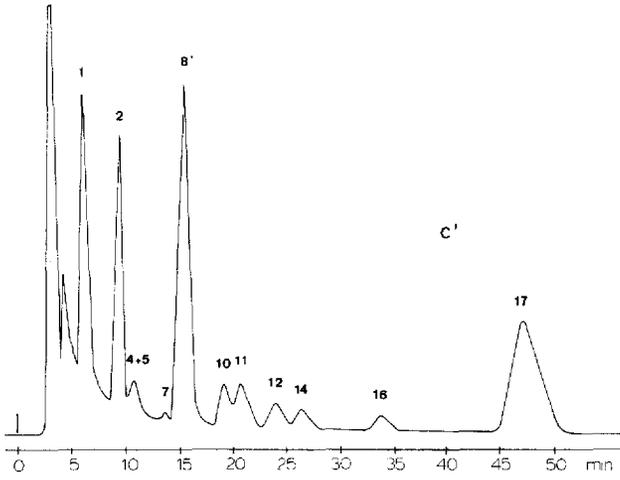


Fig. 6. Quelques exemples d'analyses de végétaux: (c'), *Loiseleuria procumbens* Desf. (Ericaceae); (d'), *Trifolium alpinum* L. (Papilionaceae); (e'), *Festuca supina* Schurr. (Gramineae). Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 1; acide *p*-anisique, étalon interne.

dans les végétaux. Elle permet en particulier de montrer que la nature du tapis végétal joue un rôle important dans la composition phénolique du sol; ce qui constitue une base de travail très intéressante pour la comparaison des sols de haute montagne, tant du point de vue statique que dynamique.

## RÉSUMÉ

Nous décrivons une méthode d'analyse des acides et aldéhydes phénoliques par chromatographie liquide haute-performance en phase inverse, avec un système d'élution isocratique ternaire. Cette méthode est appliquée à la séparation et au dosage des composés phénoliques issus: (1) de l'espèce végétale dominante sur ces sols. Les fractions phénoliques du sol et de la plante sont extraites de façon rigoureusement identique suivant un protocole que nous détaillons.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. B. Harborne et N. W. Simmonds, dans J. B. Harborne (Rédacteur), *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, 1964, p. 77.
- 2 P. Ribèreau-Gayon, *Les Composés Phénoliques des Végétaux*, Dunod, Paris, 1968, p. 87.
- 3 D. C. Whitehead, H. Buchan et R. D. Hartley, *Soil Biol. Biochem.*, 7 (1975) 65.
- 4 C. H. Chou et Z. A. Patrick, *J. Chem. Ecol.*, 2 (1976) 369.
- 5 L. Serve, *Thèse Doctorat Spécialité*, Université de Montpellier, Montpellier, 1972, p. 71.
- 6 L. Serve, *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, 280 (1975) 2317.
- 7 R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol. 4, Birkhäuser, Basel, 1966, p. 65.
- 8 J. B. Harborne et C. A. Williams, *Bot. J. Linn. Soc.*, 66 (1973) 37.
- 9 A. Temple, *Thèse Doctorat ès-Sciences Pharmaceutiques*, Université de Montpellier, Montpellier, 1978, p. 101.
- 10 L. W. Wulf et C. W. Nagel, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 271.
- 11 W. A. Court, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 287.
- 12 J. B. Murphy et C. A. Stutte, *Anal. Biochem.*, 86 (1978) 220.
- 13 J. M. Hardin et C. A. Stutte, *Anal. Biochem.*, 102 (1980) 171.
- 14 B. A. Charpentier et J. R. Cowles, *J. Chromatogr.*, 208 (1981) 132.
- 15 F. Villeneuve, G. Abravanel, M. Moutounet et G. Alibert, *J. Chromatogr.*, 234 (1982) 131.
- 16 R. D. Hartley et H. Buchan, *J. Chromatogr.*, 180 (1979) 139.
- 17 L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 352.
- 18 L. R. Snyder, dans J. J. Kirkland (Rédacteur), *Chromatographie en Phase Liquide*, Gauthiers-Villars, Paris, 1972, p. 107.
- 19 R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, Varian, Orsay, France, 1975, p. 104.
- 20 P. A. Realini, *J. Chromatogr. Sci.*, 19 (1981) 124.