

## Note

---

### Microdosage rapide des groupements alkoxyes par chromatographie en phase gazeuse

#### Application à la lignine

M. GIRARDIN\* et M. METCHE

*Laboratoire de Biochimie Appliquée, École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, B.P. 308, 54006 Nancy Cédex (France)*

(Reçu le 11 mars 1983)

La détermination des groupements alkoxyes est une donnée particulièrement importante pour la caractérisation des biopolymères phénoliques complexes tels que la lignine. Par le biais de ce dosage, on peut appréhender non seulement les taux de méthoxyes ou d'éthoxyes mais également celui des hydroxyes totaux ou plus spécifiquement des hydroxyes aromatiques. Il suffit pour cela de méthyler ces fonctions et de déterminer ensuite l'augmentation de la teneur en méthoxyes. En procédant de cette manière, on peut suivre la dégradation chimique ou enzymatique d'une lignine en mesurant le nombre des groupements hydroxyes libérés provenant par exemple des liaisons aryl éther. Cependant ceci n'est intéressant que si l'on dispose d'une technique de dosage aisée et rapide à mettre en oeuvre.

Actuellement, la détermination classique des alkoxyes repose sur la méthode de Zeisel qui consiste à transformer ces groupements en iodure d'alkyles correspondants par traitement à l'acide iodhydrique bouillant:



Ceux-ci sont ensuite séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse. Les inconvénients de cette méthode résident dans l'utilisation d'un appareillage complexe et surtout dans la longueur et le nombre des manipulations: réaction, distillation, piégeage et analyse. Ainsi pour l'attaque par HI, il est nécessaire de soumettre chaque échantillon à un chauffage sous reflux pendant au moins trente minutes en évitant toute perte des iodures d'alkyles formés. Ces dérivés halogénés très volatiles doivent être ensuite récupérés quantitativement; pour cela de nombreuses solutions ont été proposées telles que l'entraînement et le piégeage dans différents solvants<sup>1,2</sup>, la condensation dans un piège refroidi<sup>3,4</sup> ou encore l'extraction directe du milieu réactionnel par le tétrachlorure de carbone<sup>5</sup>. Malheureusement aucune de ces solutions ne donne entière satisfaction. Il apparaît dès lors que ces divers protocoles ne sont pas adaptés à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

Dans cette note, nous proposons une version améliorée de la méthode de Zeisel qui se caractérise à la fois par sa rapidité, son efficacité et ses besoins limités en

appareillage spécifique. Après l'avoir expérimentée sur des échantillons de lignine de peuplier, nous discutons les résultats obtenus.

## MATERIELS ET METHODES

### *Dosage des groupements alkoxyles*

L'échantillon de 3 à 10 mg est introduit dans un tube à vis de 28 ml (type Sovirel) avec 5 ml de HI à 57% (Merck). Chaque tube hermétiquement fermé au moyen d'un bouchon à vis muni d'un joint en PTFE est placé 20 min dans une étuve à 150°C. Après refroidissement à 4°C, on rajoute 10 ml d'eau distillée et 10 ml de benzène avant de laisser revenir l'ensemble à température ambiante. Une agitation vigoureuse du tube fait passer les iodures d'alkyles formés dans la phase benzénique surnageante. On prélève alors 1  $\mu$ l de cette phase que l'on injecte directement dans un chromatographe en phase gazeuse. Il s'agit ici d'un chromatographe Packard 437 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes: Colonne: Carbowax 20M à 20% sur Chromosorb W AW; 2.5 m  $\times$  3 mm I.D. Températures: colonne 80°C; détecteur et injecteur 100°C. Débit du gaz vecteur N<sub>2</sub>: 25 ml/min.

Si l'analyse chromatographique n'est pas faite immédiatement, il est préférable de maintenir les tubes réactionnels à l'obscurité.

Le taux de groupements alkoxyles est déterminé par comparaison avec une courbe étalon en mesurant la surface des pics respectifs. Dans le cas du dosage des méthoxyles de la lignine, cette courbe étalon a été établie en traitant des quantités croissantes d'acide vanillique selon le processus décrit pour les échantillons. Elle présente les caractéristiques suivantes: pente 0.546, origine 0.4 mm, coefficient de corrélation 0.995. Pour tous les dosages, l'hexane est utilisé comme étalon interne.

### *Application à la lignine*

C'est une lignine de peuplier (*Populus nigra* var. *Robusta*) extraite de la sciure par le dioxanne selon la méthode de Pepper *et al.*<sup>6</sup>.

*Méthylation totale.* A 200 mg de lignine dissoute dans 15 ml de dioxanne à 96% (v/v), on ajoute 3 g de soude broyée et 2 ml de sulfate de méthyle. Après 4 jours d'agitation à température ambiante, le mélange est neutralisé par HCl 1 N. La lignine entièrement méthylée est alors précipitée par l'éther éthylique puis recueillie par centrifugation.

*Méthylation spécifique des OH phénoliques.* Dans un ballon équipé d'un réfrigérant descendant et contenant 30 ml d'éther éthylique refroidis par un bain d'eau glacée, on ajoute 2 g de N,N'-dinitrosodiméthyltéréphtalimide et 10 ml d'une solution de potasse à 4% (w/v). On laisse au repos pendant 5 min de façon à permettre la libération du diazométhane puis on chauffe 40°C pour distiller le mélange diazométhane-éther. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer contenant 1 g de lignine dissoute dans un mélange dioxanne-méthanol (10:2, v/v) refroidi à 0°C. Après 40 h à 4°C, la solution est évaporée et le résidu est repris par 10 ml de dioxanne. La lignine spécifiquement méthylée est précipitée par l'éther éthylique puis recueillie par centrifugation.

TABLEAU I  
TEMPS DE RETENTION DES COMPOSÉS ANALYSES

<i>Composés</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>
Hexane (étalon interne)	1.8
CH <sub>3</sub> I	3.2
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> I	4.3
Benzène	5.5

## RESULTATS

Par rapport au procédé classique, l'originalité de la méthode réside dans l'utilisation d'un simple tube à vis placé à 150°C pour effectuer la réaction, d'où la possibilité de traiter un grand nombre d'échantillons à la fois. L'attaque est complète au bout de vingt minutes même avec une substance aussi complexe que la lignine. L'extraction des iodures d'alkyles par le benzène ajouté directement aux tubes réactionnels permet de limiter efficacement les pertes; le benzène étant un excellent solvant de ces dérivés halogénés, la récupération est toujours supérieure à 97 %. Les iodures d'alkyles contenus dans la phase benzénique sont ensuite dosés par chromatographie en phase gazeuse. Pour cette analyse, le benzène présente l'avantage par rapport au tétrachlorure de carbone, de pouvoir être prélevé sans manipulation supplémentaire. Les conditions chromatographiques retenues permettent une excellente séparation des iodures de méthyle et d'éthyle en quelques minutes (Tableau I).

Les teneurs en iodures d'alkyles peuvent être déterminées par rapport à des courbes étalons préétablies en iodures de méthyle et d'éthyle. On en déduit ensuite le taux de méthoxyle ou d'éthoxyle. A partir de composés méthoxylés simples du commerce (vanilline, par exemple), nous avons d'ailleurs pu vérifier que les quantités

TABLEAU II  
TENEUR EN MÉTHOXYLES DE LA LIGNINE DE PEUPLIER AU DIOXANNE AVANT ET APRÈS MÉTHYLATIONS

<i>Lignine</i>	<i>Echantillons (mg)</i>	<i>OCH<sub>3</sub> (%)</i>	<i>OCH<sub>3</sub> moyen (%)</i>
Après extraction	9.4	14.38	14.5
	9.5	14.76	
	15.0	14.33	
	10.1	14.54	
Après méthylation par CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	2.0	19.67	19.6
	7.5	19.71	
	17.6	19.49	
Après méthylation par (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.4	32.98	33.1
	5.0	33.22	

TABLEAU III

TENEURS EN OCH<sub>3</sub>, EN OH TOTAUX ET OH PHENOLIQUES DE LA LIGNINE DE PEUPLIER

Groupements fonctionnels	Taux (moles/100 g)
OCH <sub>3</sub>	0.47
OH Phénoliques	0.18
OH Totaux	0.70

de méthoxyles déterminées expérimentalement par ce protocole simplifié sont en concordance étroite avec les quantités théoriques calculées. Cependant pour le dosage sur des substances plus complexes, il est préférable d'établir la courbe étalon à partir de composés alkoxylés de nature voisine auxquels ont fait subir le même traitement: ainsi, dans le cas de la lignine qui contient essentiellement des groupements méthoxyles, la courbe étalon a été obtenue en utilisant l'acide vanillique.

Dans le Tableau II sont présentés les différents taux de méthoxyles déterminés sur une lignine de peuplier avant et après méthylation totale par le sulfate de méthyle ainsi qu'après méthylation spécifique des hydroxyles phénoliques par le diazométhane.

A partir de ces données, on peut déduire le nombre  $n$  de fonctions méthylables selon la formule:

$$n = \frac{t_2 - t_1}{31 - 0.14 t_2}$$

avec  $t_1 = \% \text{OCH}_3$  avant méthylation;  $t_2 = \% \text{OCH}_3$  après méthylation

Le Tableau III indique les teneurs en groupements fonctionnels ainsi calculées pour la lignine de peuplier au dioxanne.

Les résultats du Tableau II tendent à confirmer la fiabilité de la méthode de dosage quel que soit le poids de l'échantillon mis en oeuvre, même pour des prises d'essai très faibles de l'ordre de 2 à 5 mg. Les taux de groupements fonctionnels (Tableau III) sont en accord avec ceux de la littérature<sup>7,8</sup> et avec le modèle structural hypothétique de la lignine établi par Freudenberg<sup>9</sup>.

L'ensemble de ces résultats donne à penser que la méthode de dosage des groupements alkoxylés décrite ici peut avantageusement remplacer le procédé classique étant donné sa rapidité et sa précision.

## REFERENCES

- 1 J. L. Puech, C. Jouret et L. Deibner, *Indust. Alim. Agric.*, 1 (1978) 13.
- 2 W. Merz, *Z. Anal. Chem.*, 232 (1967) 82.
- 3 D. L. Miller, E. P. Samsel et T. G. Cobler, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 677.
- 4 M. Schachter et T. S. Ma, *Mikrochim. Acta*, 11 (1966) 55.
- 5 K. F. Sporek et M. D. Danyi, *Anal. Chem.*, 34 (1962) 1527.
- 6 J. M. Pepper, P. E. T. Baylis et E. Adler, *Can. J. Chem.*, 37 (1959) 1241.
- 7 J. Rouger, *Thèse*, Université de Grenoble, Grenoble, 1973.
- 8 C. J. Ververloo, *Acta Bot. Neerl.*, 18 (1969) 242.
- 9 K. Freudenberg, *Chim. Biochim. Lignine, Cellulose Hemicelluloses*, Actes Symp. Intern., Grenoble, 1964. p. 39.