

CHROM. 16,663

## Note

---

### **Dosage par chromatographie liquide haute-performance des composés phénoliques libérés par hydrolyse d'acides humiques**

LÉON SERVE\* et LOUIS PIOVETTI

*Laboratoire de Biologie Végétale, 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 12 décembre 1983; manuscrit modifié reçu le 14 février 1984)

Les acides humiques des sols sont des macromolécules complexes dont la détermination de structure retient actuellement l'attention de nombreux chimistes organiciens. Plusieurs procédés ont été mis en oeuvre pour les purifier et les analyser<sup>1-3</sup>. Parmi ceux-ci, l'hydrolyse acide permet de libérer des substances phénoliques: acides et aldéhydes résultant de la dégradation de la lignine et de l'incorporation de phénols rencontrés dans les végétaux<sup>1,4</sup>. L'étude de cet hydrolysate contribue à apporter des précisions sur le degré de décomposition des résidus végétaux dans le sol et suggère l'étroite relation existant entre la composition chimique et le type de la couverture végétale<sup>4-6</sup>.

Les principales techniques de dosage décrites actuellement pour les produits d'hydrolyse des acides humiques ne sont basées que sur la chromatographie gazeuse (CGL)<sup>1-4,7</sup>. Aucun travail de chromatographie liquide haute-performance (CLHP) n'a été entrepris, malgré la supériorité de la méthode en ce qui concerne la séparation et le dosage des composés phénoliques<sup>8-14</sup>.

Dans le cadre de notre étude phyto-écologique de l'étage alpin des Pyrénées-Orientales (France)<sup>15,16</sup>, nous avons mis au point une méthode d'analyse des acides et aldéhydes phénoliques par CLHP sur colonne à polarité de phase inversée, avec un système d'élution isocratique ternaire<sup>17</sup>. Elle nous a permis de doser les substances phénoliques contenues dans la fraction acides fulviques des sols de haute montagne pyrénéens et de leur végétation.

Nous proposons en complément de ce travail, une méthode simple et reproductible de dosage par CLHP des composés phénoliques libérés par hydrolyse acide de la fraction acides humiques. Elle s'inspire de la précédente<sup>17</sup>, à laquelle nous apportons une nette amélioration dans la séparation des acides mono- et dihydroxybenzoïques.

## 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, 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, on utilise une seule colonne en acier inoxydable, 250  $\times$  4 mm, remplie de LiChrosorb RP-18 de granulométrie moyenne 5  $\mu$ m (E. Merck, Darmstadt, Allemagne Fédérale). L'efficacité de cette colonne est supérieure à celle qui avait été obtenue avec deux colonnes de LiChrosorb RP-18 de granulométrie 7  $\mu$ m montées en série<sup>17</sup>.

*Solvants*

Trois solvants sont utilisés en mélange ternaire: eau, acétonitrile, acide acétique. Les deux solvants organiques sont des produits Merck p.a. (E. Merck). 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, *p*-coumarique, férulique, *p*-anisique et aldéhydes syringique, *p*-hydroxybenzoïque (Aldrich-Europe, Belgique); acides dihydroxy-3,4-benzoïque (acide protocatéchique) et dihydroxy-3,5-benzoïque (Fluka, Suisse); vanilline et acide benzoïque (E. Merck).

*Extraction et hydrolyse acide des acides humiques*

La Fig. 1 illustre l'ensemble du protocole expérimental. La technique d'extraction de la matière organique [acides fulviques (AF) et acides humiques (AH)] a été décrite<sup>17</sup>. L'hydrolyse acide des AH est effectuée en tube scellé pendant 16 h à 120°C avec 5 ml d'acide chlorhydrique 6 *N*. On centrifuge à 6500 g. Le surnageant (hydrolysate acidosoluble) est extrait à l'acétate d'éthyle (AcOEt). La phase organique est refroidie à -40°C pour éliminer l'eau, séchée sur sulfate de magnésium anhydre, puis évaporée.

Cette technique s'applique à la fois au sol et au végétal sec<sup>17</sup>.

*Préparation des solutions pour l'analyse 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.

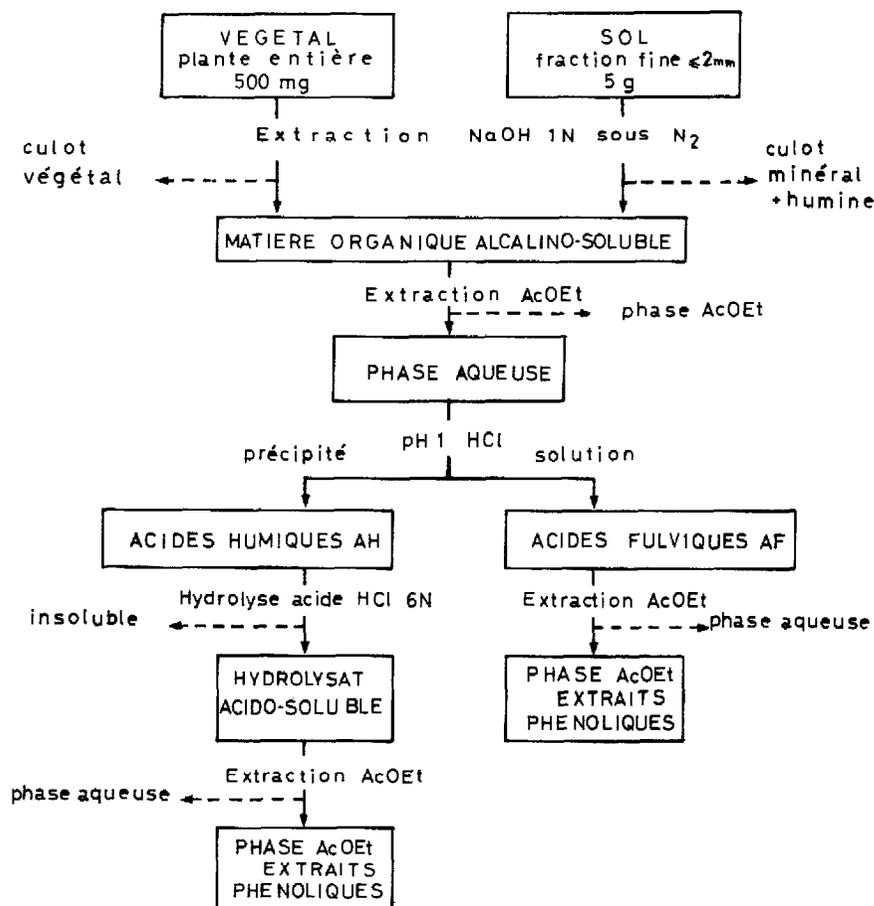


Fig. 1. Extraction et hydrolyse acide des acides humiques.

L'extrait AcOEt de l'hydrolysate acidosoluble des AH est dissous dans 1 ml de méthanol. On en prélève 0.5 ml, auquel on ajoute 0.1 ml de solution-mère d'acide *p*-anisique. La solution obtenue est injectée directement en CLHP.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Dans les conditions d'analyse décrites dans notre précédent article<sup>17</sup> —deux colonnes à polarité de phase inversée (LiChrosorb RP-18 de granulométrie moyenne 7  $\mu\text{m}$ ) montées en série, avec un système d'éluion isocratique ternaire (eau-acétonitrile-acide acétique (84:14:2) et un débit de 1.5 ml/min— nous avons montré que l'acétonitrile, en raison de sa faible viscosité (0.37 cP à 20°C), conduisait à une meilleure résolution des pics que les alcools généralement utilisés, tels le *n*-butanol ou le méthanol. Cependant, cette méthode ne permet pas de séparer en système isocratique l'acide vanillique de l'acide syringique ainsi que l'acide dihydroxy-3,4-benzoïque de l'acide dihydroxy-3,5-benzoïque.

Les principaux produits phénoliques résultant de l'hydrolyse acide des AH des sols étant les acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique et dihydroxy-3,4-benzoïque<sup>4,18</sup>, il fallait mettre au point une technique de séparation satisfaisante avant d'envisager une analyse quantitative de ces substances par CLHP. Dans cette optique, nous avons été amenés à améliorer notre méthode de dosage des acides et aldéhydes phénoliques. Le but était double:

- (1) séparer les acides vanillique, syringique, dihydroxybenzoïques, tout en conservant une bonne résolution des pics pour les autres dérivés hydroxybenzoïques;
- (2) vérifier sans ambiguïté la présence ou l'absence des dérivés hydroxycinnamiques dans les chromatogrammes.

Nous avons mis au point la technique de séparation sur deux mélanges de référence:

(a) acides *p*-hydroxybenzoïque, syringique, vanillique, *p*-coumarique, férulique, benzoïque et aldéhydes *p*-hydroxybenzoïque, vanilline;

(b) acides dihydroxy-3,4-benzoïque, dihydroxy-3,5-benzoïque et syringaldéhyde. L'acide *p*-anisique est ajouté à chacun de ces mélanges comme étalon interne.

Ce travail a été effectué par CLHP en polarité de phase inversée sur LiChrosorb RP-18, avec un système d'élution isocratique polaire. Dans ces conditions d'analyse, la meilleure résolution des pics est obtenue avec une seule colonne de granulométrie 5  $\mu\text{m}$ . L'acétonitrile est utilisé comme solvant d'élution, en mélange ternaire avec l'eau et l'acide acétique. Les proportions choisies: eau-acétonitrile-acide acétique (88:10:2), permettent une bonne séparation des dérivés hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, avec un débit de 0.7 ml/min (Tableau I et Figs. 2 et 3). Cet éluant conduit en particulier à la séparation en système isocratique, de l'acide vanillique et de l'acide syringique, de même qu'à celle de l'acide dihydroxy-3,4-benzoïque et de l'acide dihydroxy-3,5-benzoïque.

Le maximum d'absorption dans l'UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ) est de l'ordre de 275 nm pour les

TABLEAU I

## TEMPS DE RETENTION DES ACIDES ET ALDEHYDES DE REFERENCE

Colonne: LiChrosorb RP-18 éluee par le mélange eau-acétonitrile-acide acétique (88:10:2), avec un débit de 0.7 ml/min.

No.	Composés	Temps de rétention (min)
1	Acide dihydroxy-3,5-benzoïque	7.4
2	Acide dihydroxy-3,4-benzoïque	8.0
3	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	11.3
4	Acide vanillique	13.3
5	Acide syringique	14.1
6	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	16.3
7	Vanilline	21.0
8	Syringaldéhyde	24.3
9	Acide <i>trans-p</i> -coumarique	26.2
10	Acide <i>cis-p</i> -coumarique	26.7
11	Acide <i>trans</i> -férulique	33.2
12	Acide <i>cis</i> -férulique	34.9
13	Acide benzoïque	42.2
14	Acide <i>p</i> -anisique	58.3

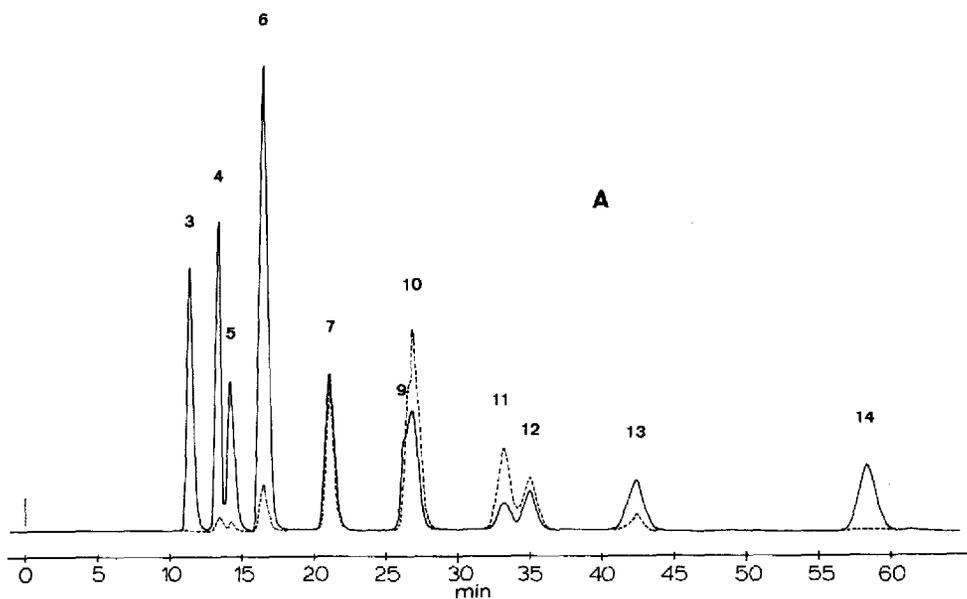


Fig. 2. Chromatogrammes du mélange de référence (A). Phase mobile: eau-acétonitrile-acide acétique (88:10:2); phase stationnaire: LiChrosorb RP-18; débit: 0.7 ml/mn; détecteur: spectrophotomètre UV réglé à 275 nm (—) ou à 320 nm (-----). Les numéros correspondent aux composés donnés dans le Tableau I.

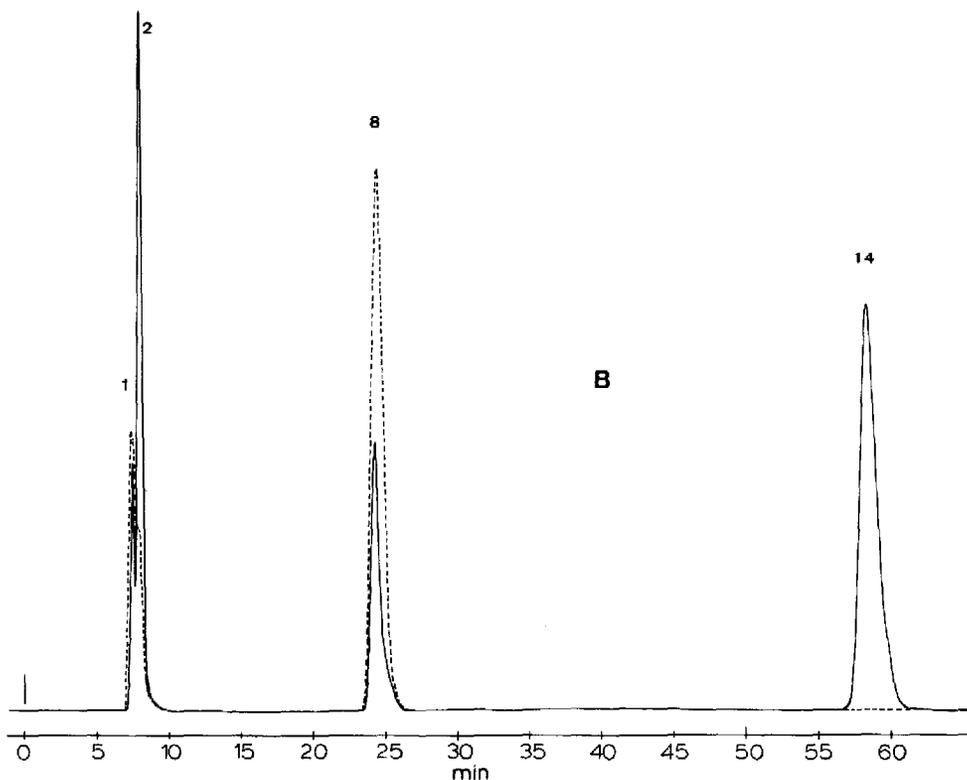


Fig. 3. Chromatogrammes du mélange de référence (B). Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 2. Les numéros correspondent aux composés donnés dans le Tableau I.

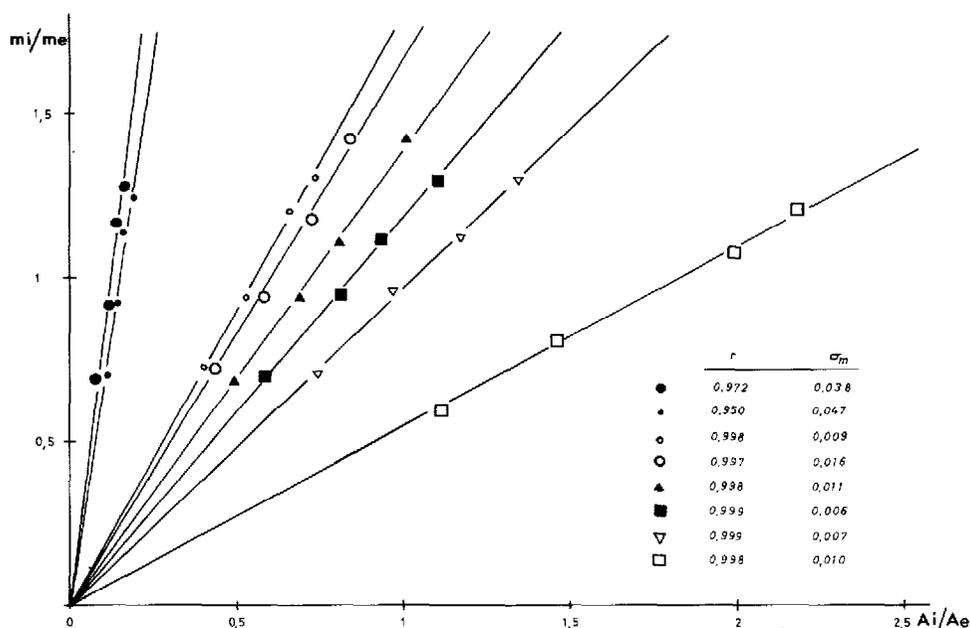


Fig. 4. Courbes d'étalonnage des acides et aldéhydes phénoliques du mélange (A) par référence à l'acide *p*-anisique (étalon interne), détecteur UV réglé à 275 nm;  $m_i/m_e$  = rapport des masses échantillon sur étalon interne;  $A_i/A_e$  = rapport des aires échantillon sur étalon interne;  $r$  = coefficient de corrélation, significatif entre 95% et 99,9%;  $\sigma_m$  = erreur-type d'estimation; (●) acide benzoïque; (•) acide *p*-hydroxybenzoïque; (◦) acide férulique; (○) acide vanillique; (▲) acide syringique; (■) acide coumarique; (▽) vanilline; (□) *p*-hydroxybenzaldéhyde. La linéarité des graphes est vérifiée pour des quantités d'échantillon injectées comprises entre 0 et 6  $\mu\text{g}$ .

acides hydroxybenzoïques alors qu'il est d'environ 320 nm pour les hydroxycinnamiques<sup>13,19,20</sup>. En réglant le détecteur UV une fois sur l'une de ces longueurs d'ondes, puis sur l'autre au cours d'une deuxième injection, on différencie nettement ces deux groupes de composés (Figs. 2 et 3). On remarque également que les aldéhydes: vanilline ( $\lambda_{\text{max}}$  éthanol 309 nm,  $\log \epsilon$  4.02), syringaldéhyde ( $\lambda_{\text{max}}$  éthanol 308.5 nm,  $\log \epsilon$  4.18) absorbent intensément à 320 nm, alors que le *p*-hydroxybenzaldéhyde ( $\lambda_{\text{max}}$  hexane 281 nm,  $\log \epsilon$  4.08) présente une absorption plus importante à 275 nm.

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. 4 et 5). L'isomérisation des acides hydroxycinnamiques sous l'action de la lumière évoluant rapidement en cours de dosage, nous avons étalonné ensemble leurs formes *cis* et *trans*<sup>17</sup>.

L'application de notre méthode CLHP aux extraits AcOEt des hydrolysats acidosolubles des AH de sols pyrénéens de haute montagne est illustrée par la Fig. 6 et le Tableau II. Cette technique peut également s'appliquer aux hydrolysats des AH "néoformés" extraits à partir des végétaux (Tableau III).

La méthode de dosage décrite dans cet article apparaît comme parfaitement applicable à l'analyse des acides et aldéhydes phénoliques résultant de l'hydrolyse acide des AH des sols. Elle permet notamment de doser sans ambiguïté les acides dihydroxy-3,4-benzoïque, dihydroxy-3,5-benzoïque, *p*-hydroxybenzoïque, vanillique,

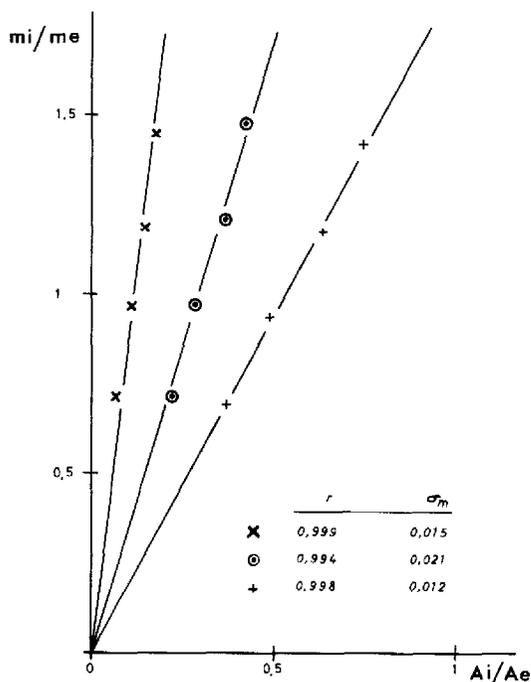


Fig. 5. Courbes d'étalonnage des acides et aldéhydes phénoliques du mélange (B) par référence à l'acide *p*-anisique (étalon interne), détecteur UV réglé à 275 nm; (x) acide dihydroxy-3,5-benzoïque; (⊙) syringaldéhyde; (+) acide dihydroxy-3,4-benzoïque. La linéarité des graphes est vérifiée pour des quantités d'échantillon injectées comprises entre 0 et 6  $\mu$ g.

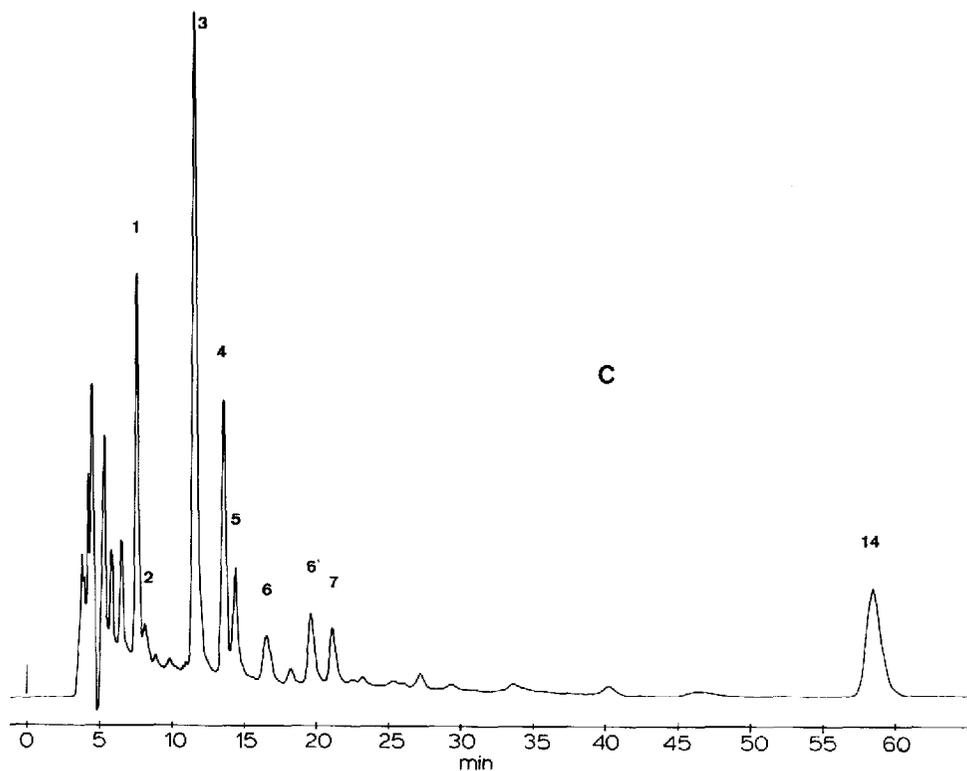


Fig. 6.

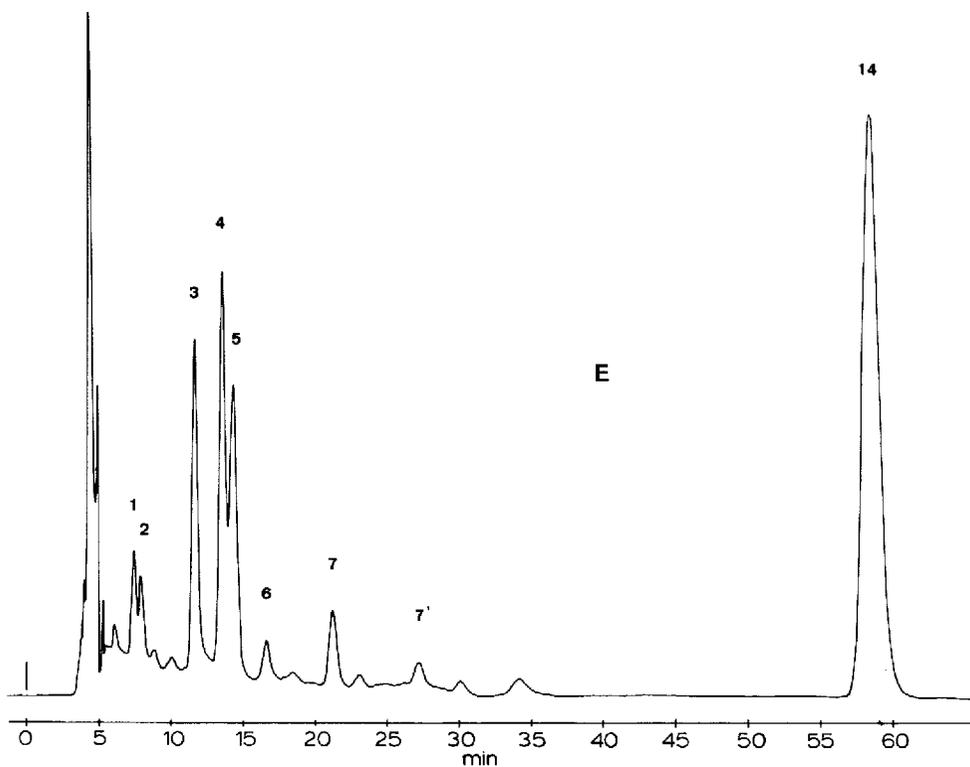
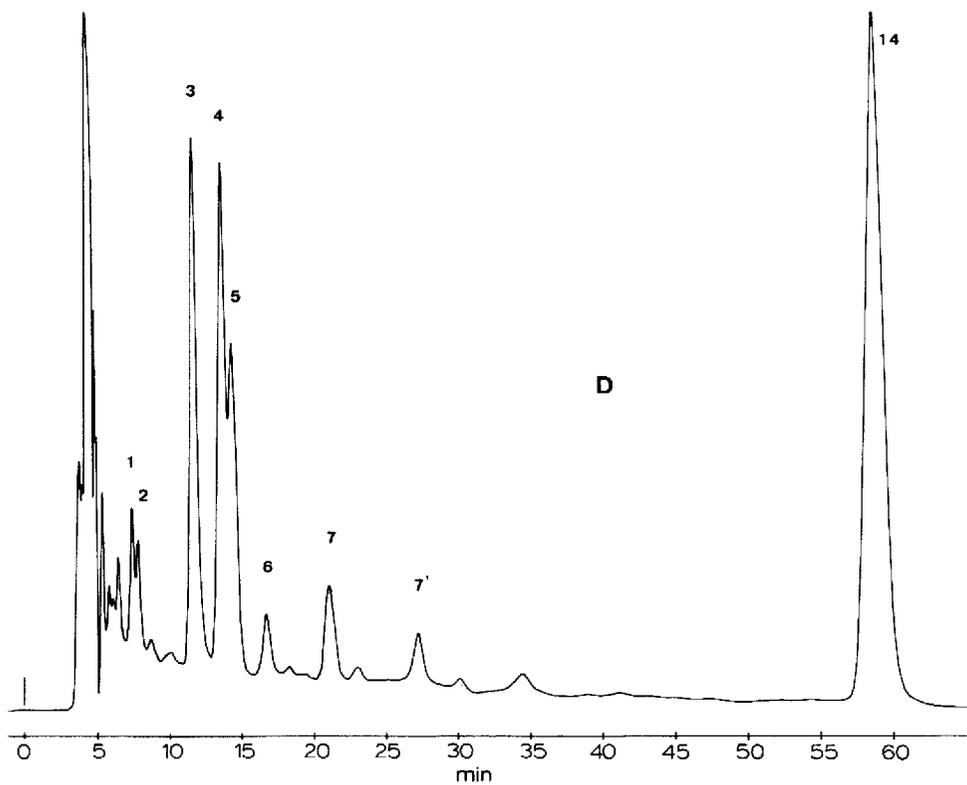


Fig. 6. Quelques exemples d'analyse d'extraits AcOEt et des hydrolysats des AH de sols: (C) sol à *Loiseleuria procumbens* Desf. (Ericaceae); (D) sol à *Trifolium alpinum* L. (Papilionaceae); (E) sol à *Festuca supina* Schurr. (Gramineae). Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 2, détecteur UV réglé à 275 nm; acide *p*-anisique, étalon interne.

TABLEAU II

COMPOSITION DES EXTRAITS AcOEt DES HYDROLYSATS DES AH ( $E_{AH}$ ) DE QUELQUES SOLS PYRÉNÉENS DE HAUTE ALTITUDE

C = Sol à *Loiseleuria procumbens* Desf.; D = sol à *Trifolium alpinum* L.; E = sol à *Festuca supina* Schurr.  $\sigma_{C,D,E}$  rel. (%): taux d'erreur-type relative sur le dosage de C, D, E. + : Présent dans le chromatogramme, non dosé.

No.	Composés	Quantité (mg/g)								
		C			D			E		
		$E_{AH}$	Sol	$\sigma_C$ rel. (%)	$E_{AH}$	Sol	$\sigma_D$ rel. (%)	$E_{AH}$	Sol	$\sigma_E$ rel. (%)
1	Ac. dihydroxy-3,5-benzoïque	72.0	0.0619	0.2	16.3	0.035	3.5	22.0	0.034	3.5
2	Ac. dihydroxy-3,4-benzoïque	8.7	0.075	1.3	3.0	0.006	15.2	4.0	0.006	15.3
3	Ac. <i>p</i> -hydroxybenzoïque	135	1.158	0.3	69	0.150	2.5	66	0.103	3.6
4	Ac. vanillique	13.4	0.115	1.1	21.4	0.045	2.8	23.0	0.036	3.6
5	Ac. syringique	4.4	0.038	2.4	11.0	0.023	3.8	16.0	0.025	3.5
6	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	1.4	0.012	6.8	traces			traces		
6'	Non identifié	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	Vanilline	2.3	0.020	2.9	2.6	0.006	9.4	3.0	0.005	11.2
7'	Non identifié	-	-	-	+	+	+	+	+	+

syringique et les aldéhydes *p*-hydroxybenzoïque, vanilline, ainsi que de vérifier l'absence de dérivés hydroxycinnamiques en utilisant comparativement leur différence d'absorption UV à 320 nm. C'est une technique plus rapide et sensible que celle de chromatographie gaz-liquide utilisée jusqu'ici.

TABLEAU III

COMPOSITION DES EXTRAITS AcOEt DES HYDROLYSATS DES AH "NEOFORMES" ( $E_{AH}$ ) DE QUELQUES VÉGÉTAUX PYRÉNÉENS DE HAUTE ALTITUDE

C' = *Loiseleuria procumbens* Desf.; D' = *Trifolium alpinum* L.; E' = *Festuca supina* Schurr.  $\sigma_{C',D',E'}$  rel. (%): taux d'erreur-type relative sur le dosage de C', D', E'. + : Présent dans le chromatogramme, non dosé.

No.	Composés	Quantité (mg/g)								
		C'			D'			E'		
		$E_{AH}$	Vég.	$\sigma_{C'}$ rel. (%)	$E_{AH}$	Vég.	$\sigma_{D'}$ rel. (%)	$E_{AH}$	Vég.	$\sigma_{E'}$ rel. (%)
1	Ac. dihydroxy-3,5-benzoïque	15	0.22	5.9	13	0.18	7.3	11	0.09	14.2
2	Ac. dihydroxy-3,4-benzoïque	-	-	-	traces			traces		
3	Ac. <i>p</i> -hydroxybenzoïque	55	0.83	5.0	33	0.45	9.2	27	0.22	18.1
4	Ac. vanillique	traces			12	0.17	8.2	traces		
5	Ac. syringique	traces			7	0.09	10.5	-	-	-
6	<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	traces			traces			traces		
6'	Non identifié	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	Vanilline	traces			traces			traces		
7'	Non identifié	-	-	-	+	+	+	+	+	+

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. Schnitzer et S. U. Khan, *Humic substances in the Environment*, Marcel Dekker, New-York, 1972, p. 137.
- 2 M. Schnitzer et S. U. Khan, *Soil Organic Matter*, Elsevier, New York, Amsterdam, 1978, p. 47.
- 3 F. Andreux dans M. Bonneau et B. Souchier (Rédacteurs), *Pédologie, Vol. 2, Constituants et Propriétés du Sol*, Masson, Paris, 1979, p. 97.
- 4 K. R. Tate et H. A. Anderson, *J. Soil Sci.*, 29 (1978) 76.
- 5 F. Jacquin, *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, 254 (1962) 2623.
- 6 F. Jacquin, *Thèse Doctorat ès-Sciences Naturelles*, Université de Nancy, Nancy, 1963, p. 110.
- 7 Nguyen Quat Hao et M. Metche, *Bull. E.N.S.A.I.A. Nancy*, 16 (1974) 77.
- 8 L. W. Wulf et C. W. Nagel, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 271.
- 9 W. A. Court, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 287.
- 10 J. B. Murphy et C. A. Stutte, *Anal. Biochem.*, 86 (1978) 220.
- 11 J. M. Hardin et C. A. Stutte, *Anal. Biochem.*, 102 (1980) 171.
- 12 B. A. Charpentier et J. R. Cowles, *J. Chromatogr.*, 208 (1981) 132.
- 13 F. Villeneuve, G. Abravanel, M. Moutounet et G. Alibert, *J. Chromatogr.*, 234 (1982) 131.
- 14 R. D. Hartley et H. Buchan, *J. Chromatogr.*, 180 (1979) 139.
- 15 L. Serve, *Thèse Doctorat Spécialité*, Université de Montpellier, Montpellier, 1972, p. 71.
- 16 L. Serve, *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, 280 (1975) 2317.
- 17 L. Serve, L. Piovetti et N. Longuemard, *J. Chromatogr.*, 259 (1983) 319.
- 18 H. A. Anderson, A. Hepburn et A. Sim, *J. Soil Sci.*, 29 (1978) 84.
- 19 G. Aulin-Erdtman et L. Hegbom, *Svensk Papperstidning*, 60 (1957) 671.
- 20 R. C. Weast (Editor), *Handbook of Chemistry and Physics*, The Chemical Rubber Co., 1970-1971, 51ième éd., p. C-75.