

## ANALYSE, PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE, DES ACIDES ORGANIQUES VÉGETAUX

P. MAZIAK et L. SALSAC

Laboratoire de physiologie Végétale Appliquée, Sorbonne, Paris  
et Laboratoire de physiologie Végétale (Nutrition Minérale), Faculté des Sciences, Paris

(Received 7 January 1965)

**Abstract**—Gas chromatography has been applied to the separation of the methyl esters of organic acids extracted from apple pulp and chestnut leaves. Qualitative results are in good agreement with those obtained by column chromatography on ion-exchange resin or silica gel. The quantity of oxalic acid contained in the aqueous or alcoholic extracts of chestnut leaves has been measured by column titration and gas-chromatography: results are also in good agreement.

L'ÉTUDE des acides organiques comptant de deux à six atomes de carbone par molécule, présente un très grand intérêt en Biologie. Ces acides interviennent en effet dans certains processus métaboliques très importants: cycle respiratoire des acides tricarboxyliques, "shunt" glyoxylique, etc. De nombreuses réactions du métabolisme intermédiaire (transamination, biosynthèse des acides gras) font également intervenir des acides  $\alpha$ -cétoniques ou  $\beta$ -hydroxylés. Une méthode simple, permettant l'analyse rapide des acides organiques d'un tissu ou milieu quelconque, rendrait évidemment les plus grands services.

Plusieurs techniques chromatographiques ont déjà été proposées pour résoudre ce problème: les *méthodes quantitatives* réalisent l'élation progressive des acides hors d'une colonne de résine échangeuse d'ions<sup>1</sup> ou d'une colonne de gel de silice.<sup>2</sup> Les chromatographies sur papier<sup>3</sup> ou sur couche mince de Silice<sup>4</sup> ont surtout été employées pour l'*identification* des acides séparés au préalable par chromatographie sur colonne. Il nous a paru intéressant d'appliquer la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des acides organiques méthylés. Cette technique présente en effet de nombreux avantages: rapidité, reproductibilité, sensibilité élevée....

Plusieurs auteurs ont annoncé récemment<sup>5-8</sup> que la séparation d'esters d'acides organiques par chromatographie en phase gazeuse était réalisable. Nous nous sommes donc proposés d'appliquer la méthode à l'étude d'extraits végétaux, de voir si elle était susceptible d'applications quantitatives et si les résultats fournis par cette nouvelle technique s'accordaient avec ceux donnés par les procédés d'étude classiques.

### *Chromatographie qualitative d'esters méthyliques témoins*

Tous les acides organiques communs dans les végétaux, de l'acide pyruvique à l'acide citrique; peuvent être chromatographiés, sous forme d'esters méthyliques, sur une phase

<sup>1</sup> A. C. HULME et L. S. C. WOOLTORTON, *J. Sci. Food Agric.* 3, 150 (1958); et A. J. COURTOISIER et J. RIBERAU-GAYON, *Bull. Soc. Chim. France*, 350 (1963).

<sup>2</sup> J. BOVE et R. RAVEUX, *Bull. Soc. Chim. France*, 376 (1957).

<sup>3</sup> R. J. CHEFTEL, R. MUNIER et M. MACHEBOUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34, 380 (1952).

<sup>4</sup> C. PASSERA, A. PEFROTTI et G. FERRARI, *J. Chromatog.* 14, 289 (1964).

<sup>5</sup> C. KOWALA, Z. H. KRANZ et K. E. MURRAY, *Australian J. Chem.* 15, 832 (1962).

<sup>6</sup> A. KUKSES et P. VISHWAKARMA, *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 2353 (1963).

<sup>7</sup> H. H. LUKE, T. E. FREEMAN et L. B. KIER, *Anal. Chem.* 35, 1916 (1963).

<sup>8</sup> H. M. KELLOGG, E. BROCHMANN-HANSSEN et A. BAER HEIN SVENDSEN, *J. Pharm. Sci.* 53, 420, 1964.

stationnaire polaire: butane-diol-succinate polymérisé (polyester de Craig), par exemple. Le temps de rétention d'un ester est d'autant plus grand que son point d'ébullition est plus élevé (Tableau 1). Nous avons choisi d'opérer à plusieurs températures, chacune permettant la chromatographie simultanée de certains groupes d'esters. A 120°-150°, on peut chromatographier un premier groupe d'esters allant du pyruvate de méthyle au glutarate de méthyle (Fig. 1). Les esters plus lourds (jusqu'au citrate de méthyle) sont mieux étudiés à 200°-220°.

TABLEAU 1. CHROMATOGRAPHIE DES ESTERS DES ACIDES ORGANIQUES SUR POLYESTER DE CRAIG

Esters méthyliques d'acide organique	T° d'ébul- lition	<i>V'</i> , relatifs au volume de rétention du succinate de méthyle*		
		°T de la colonne		
		120°	150°	200°
Pyruvate	137	0,14	0,15	
Lactate	144,8	0,19	0,21	
Glycolate	151,2	0,28	0,28	
Oxalate	163,3	0,39	0,4	
Malonate	181	0,62	0,64	
Fumarate	192	0,86	0,85	
Succinate	192,8	1	1	
Citraconate			1,13	
Maléate	205		1,29	
Glutarate			1,9	1,54
Adipate			3	2,3
Malate	242		4,4	4
α-Céto-glutarate				4,85
Trans-aconitate				8,1
Glycérate	244			9,6
Citrate	287			16,3

\*  $t_R'$  = 32 min, 15 min et 3 mn à 120°, 150° et 200° respectivement.

*Conditions expérimentales:* Phase stationnaire, Butane-Diol-Succinate (20%) sur chromosorb W silanisé (80%) calibre: 60-80 mesh. Gaz vecteur: Azote; débit 3 l/h—Colonne en laiton; longueur: 3 m, diamètre intérieur: 6 mm—DéTECTEUR à ionisation de flamme (appareil commercial: chromagas C.G.1)

Nous nous sommes particulièrement attachés au comportement chromatographique du pyruvate de méthyle. Kursis et Vishwakarma<sup>7</sup> avaient déjà signalé que les acides α-cétioniques ont un comportement assez irrégulier: ainsi l'acide oxalacétique méthylé donnait 3 pics sur leurs chromatogrammes. Nous avons constaté que l'acide pyruvique, méthylé seul, donnait souvent deux pics sur les chromatogrammes, le second présentant le même temps de rétention que le glycolate de méthyle (Fig. 1). Méthylé en mélange avec d'autres acides organiques, l'acide pyruvique ne donne parfois, sur les chromatogrammes, que le deuxième pic.

Si le mélange à séparer contient à la fois des esters d'acides inférieurs (pyruvique, glycérique, etc.) et d'acides plus lourds (glycérique, citrique, etc.), la programmation de la température, en cours de chromatographie, de 80 à 230°C, par exemple, permet d'obtenir d'excellentes séparations (Fig. 2).

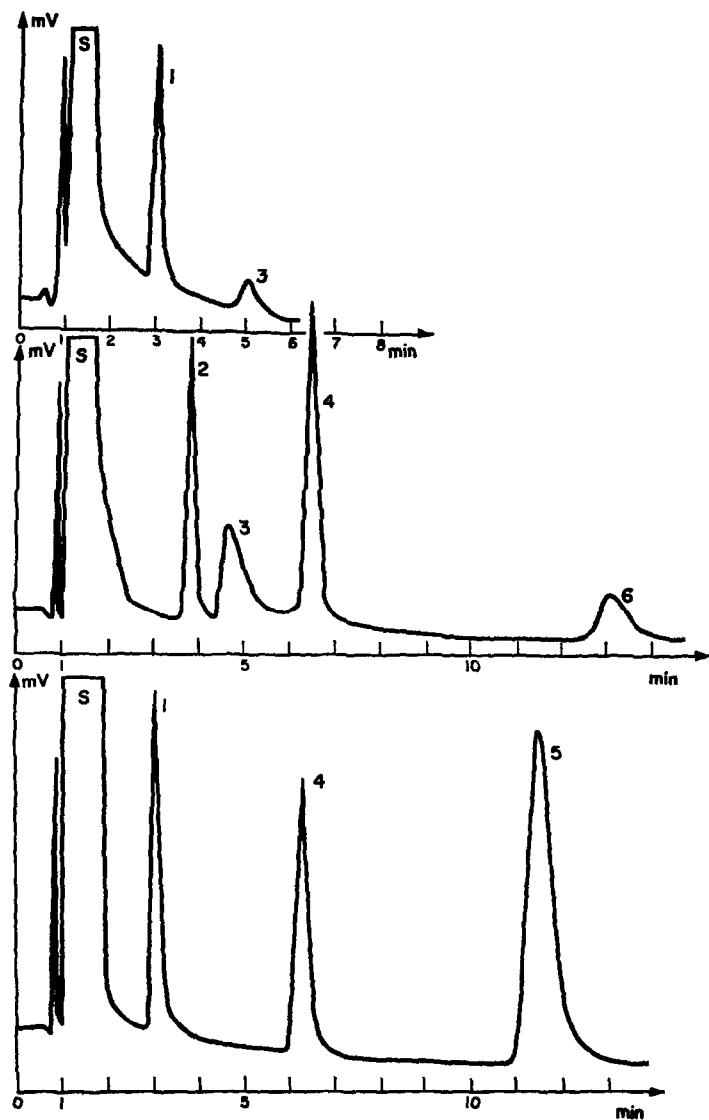


FIG. 1. Chromatogrammes d'esters méthyliques d'acides organiques inférieurs. (Colonne en laiton; 3 m de longueur —  $\frac{1}{2}$  de "pouce" de diamètre intérieur. Phase stationnaire: butane-diol-succinate (20% en poids) sur chromosorb W hexaméthyldisilanisé (60-80 mesh). Gaz vecteur: azote. Débit: 3 l/h. Température: 120°C. Détecteur à ionisation de flamme.)

Nature des pics: 1:pyruvate-2:lactate-3:glycolate et deuxième pic du pyruvate-4: oxalate-5:fumarate-6:succinate. S:solvant : méthanol.

#### *Chromatographies qualitatives d'esters d'acides extraits de végétaux*

Nous avons constaté que la chromatographie en phase gazeuse permet l'identification des principaux acides organiques extraits d'un organe végétal, par comparaison des temps de rétention des esters des acides inconnus avec les temps de rétention d'esters témoins. Nous présentons ci-dessous les résultats obtenus sur trois extraits végétaux.

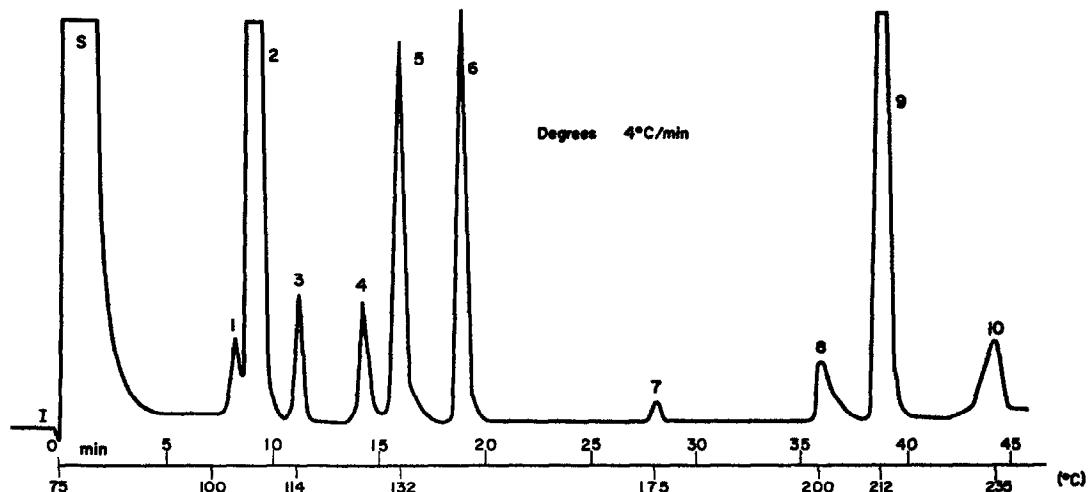


FIG. 2. Chromatogramme d'un mélange d'esters méthyliques d'acides organiques. (Colonne en acier inoxydable de 2 m de longueur sur  $\frac{1}{4}$  de "pouce" de diamètre intérieur. Phase stationnaire: diéthylène-glycol-succinate (20% en poids) sur chromosorb W (60-80 mesh). Gaz vecteur: hélium. Débit: 3 l/h. Température programmée de 75 à 235°C, au rythme de 4°C/mm. Détecteur: catharomètre. (Appareil à double colonne.)

Nature des pics: 1:pyruvate-2:lactate-3:oxalate-4:fumarate-5:succinate-6:maléate-7:malate-8:glycerate-9:citrate-10:isocitrate.

Nous avons d'abord comparé le chromatogramme (obtenu dans un système Hélium-Polyester) des esters méthyliques des acides organiques extraits de 100 g de pulpe de pommes Calville avec le chromatogramme résultant d'une élution progressive des acides du même extrait, hors d'une colonne de résine anionique, selon la méthode de Hulme et Wooltorton (Les substances éluées hors de la colonne de résine ont été identifiées par chromatographie complémentaire sur papier.<sup>9</sup>)

La comparaison des deux chromatogrammes montre que les résultats fournis par les deux méthodes sont concordants (Fig. 3). L'acide malique, dans les deux cas, forme plus de 99% de la masse des acides totaux. Les acides secondaires (citrique, succinique) mis en évidence par chromatographie sur résine sont retrouvés par l'analyse en phase gazeuse, à l'exception des acides cycliques quinique et shikimique. Quelques traces d'esters supplémentaires sont détectées par la nouvelle technique expérimentée. Nous avons vérifié que, dans nos conditions expérimentales, du malate de méthyle témoin, injecté seul, ne donnait aucun pic parasite en cours d'analyse.

Une deuxième comparaison a porté sur les acides organiques présents dans les feuilles de chataigner. Les acides ont été extraits de 10 g de matière fraîche, successivement par l'alcool puis par l'eau. Les extraits aqueux et alcoolique ont été divisés en deux fractions égales qui ont été analysées par chromatographie sur colonne de gel de Silice, d'une part, (selon la méthode de Bove<sup>2</sup>), par chromatographie en phase gazeuse après méthylation préalable, d'autre part. La Fig. 4 présente les chromatogrammes des acides ou esters de l'extrait aqueux obtenus par les deux techniques. Dans les deux cas on n'observe pratiquement qu'un pic correspondant à l'acide oxalique L'acide élué hors de la colonne de gel de Silice a été rechromatographié sur papier; cette analyse complémentaire confirme bien qu'il s'agit d'acide oxalique. La Fig. 5

<sup>9</sup> J. J. MACHEIX, D.E.S., Paris, Faculté des Sciences, 64 pp. (1963).

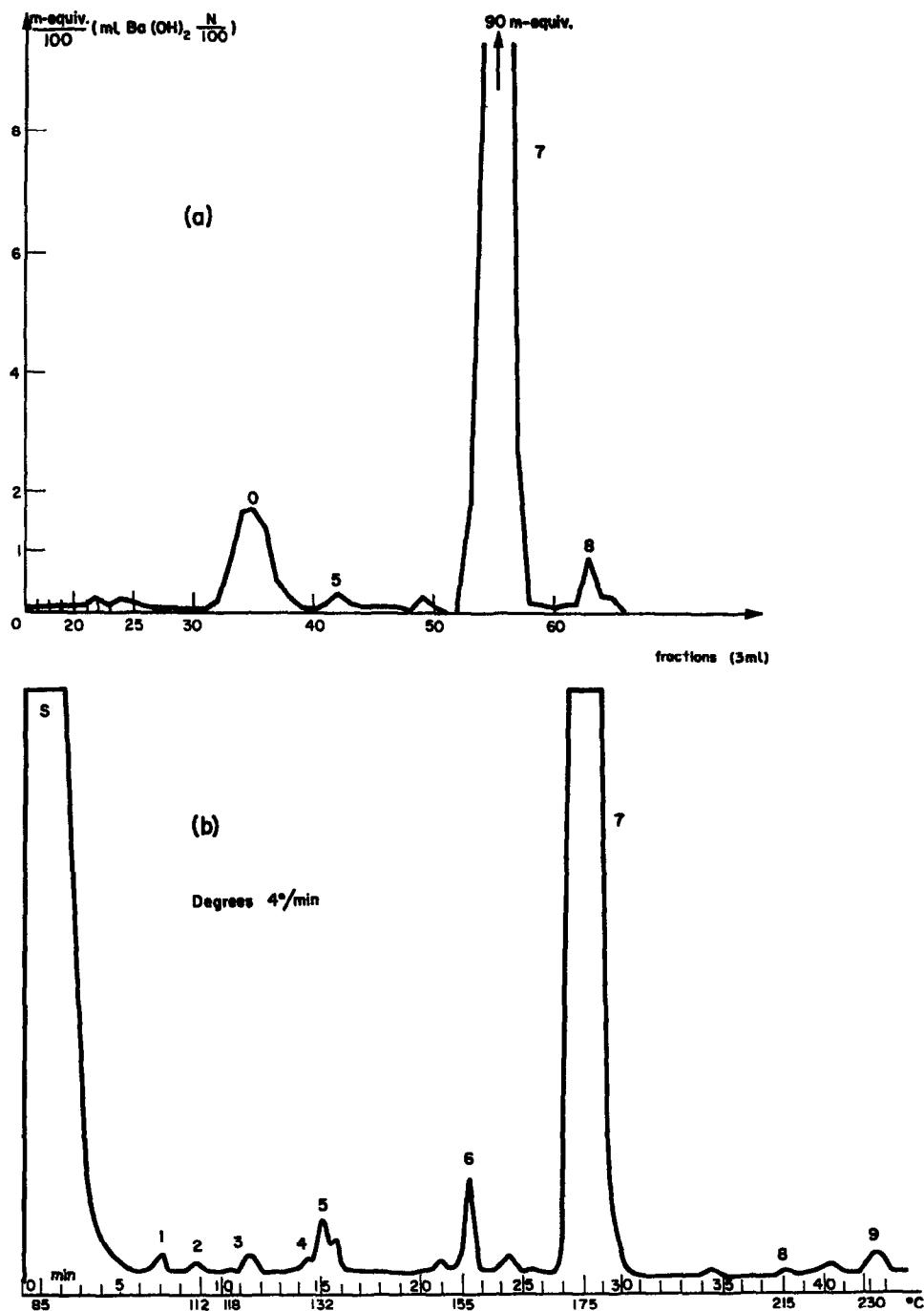


FIG. 3(A): Diagramme d'élution, sur résine anionique, des acides organiques extraits de 100 g de pulpe de pomme. (B): Chromatogramme (sur diéthylène-glycol-succinate, avec programmation de température) des esters méthylliques des mêmes acides.

0: quinate et shikimate-1:pyruvate-2:glycolate-3:oxalate-4:fumarate-5:succinate-6:adipate-7: malate-8:citrate-9:isocitrate. (S:solvant = méthanol.)

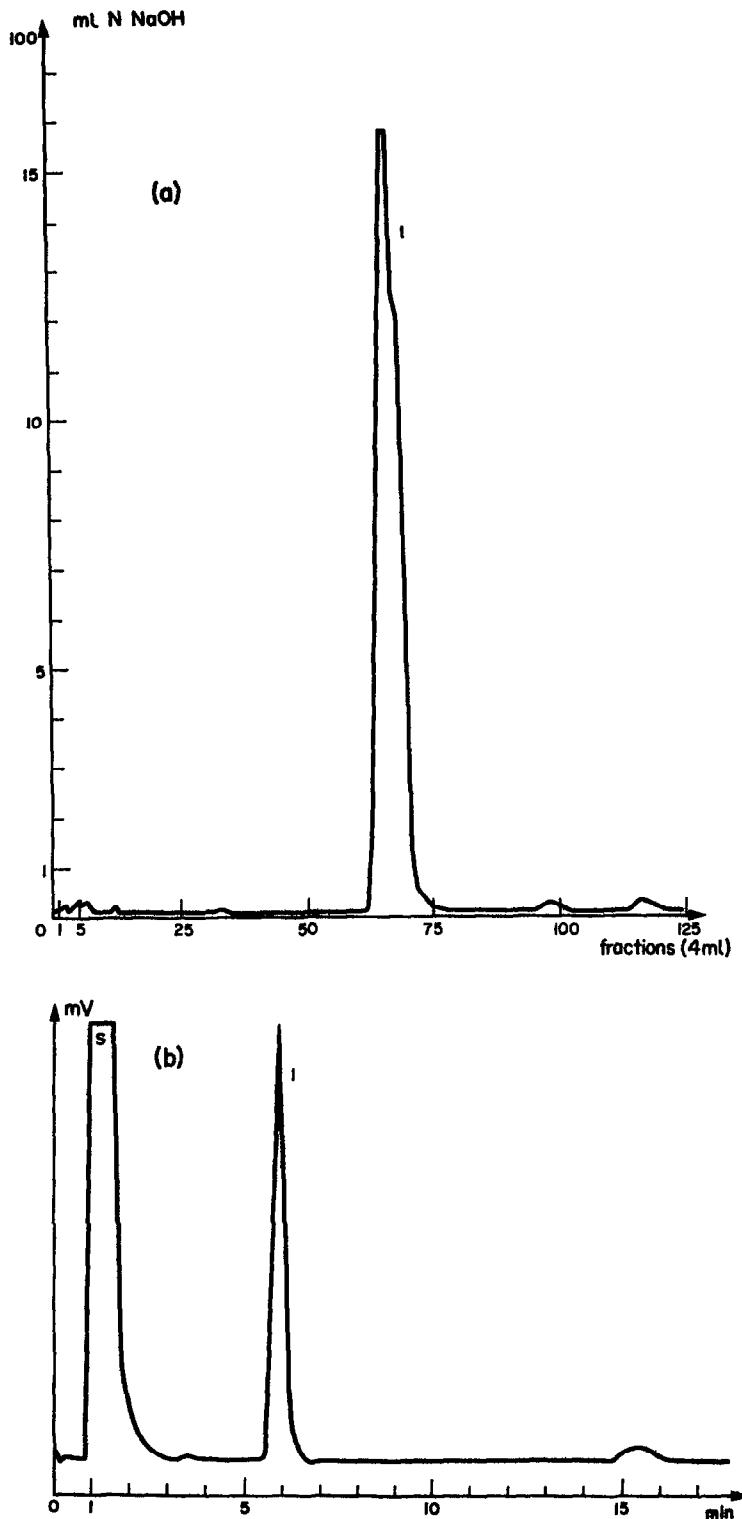


FIG. 4. (A): Chromatogramme, sur gel de silice, des acides organiques de l'extrait aqueux des feuilles de Chataigner. (B): Chromatogramme des esters méthyliques des mêmes acides, obtenu sur butane-diol-succinate (mêmes conditions expérimentales qu'à la Fig. 1).

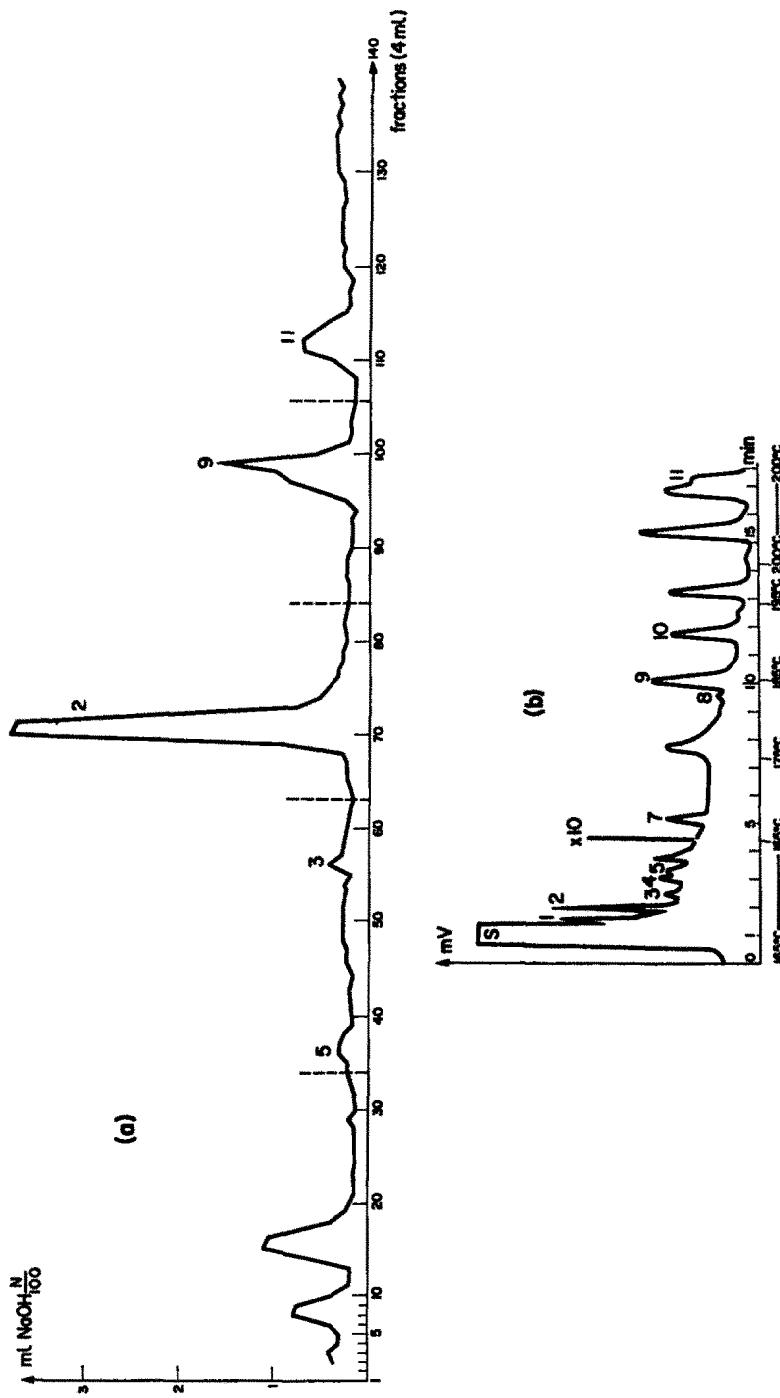


FIG. 5. (A): Chromatogramme, sur gel de Silice, des acides organiques de l'extrait alcoolique des feuilles de Chataigner. (Les lignes pointillées indiquent les changements de mélange éluant.) (B): Chromatogramme des esters méthyliques des mêmes acides, obtenu sur butane-diol-succinate. (Mêmes conditions expérimentales qu'à la Fig. 1. La température est programmée pendant une partie de la chromatographie.)  
 1: pyruvate-glycolate-2: oxalate-3: malonate-4: fumarate-5: succinate-6: citraconate-7: adipate-8:  $\alpha$ -cétoglutarate-9: malate-10: aconitate-11: citrate. (S: solvant = méthanol.)

permet la comparaison des chromatogrammes des acides ou esters de l'extrait alcoolique des feuilles de châtaignier, obtenus par les deux méthodes. Les résultats sont concordants. Les principaux acides identifiés: succinique, malonique, oxalique, malique, citrique se retrouvent dans les deux chromatogrammes. Quelques acides supplémentaires sont mis en évidence par la chromatographie en phase gazeuse.

#### *Chromatographies quantitatives d'esters témoins*

Les études quantitatives ont été faites sur le chromatographe commercial chromag C.G.1, à détecteur par ionisation de flamme. La phase stationnaire utilisée était le polyester de Craig adsorbé sur du Chromosorb W silanisé (20 g de phase stationnaire pour 80 g de support; diamètre des particules: 60-80 mesh). Le gaz vecteur est l'Azote.

Un étalonnage systématique de la réponse de détecteur en fonction de la quantité d'ester injectée dans l'appareil nous a montré: 1. Que la réponse de détecteur était linéaire pour les différents corps étudiés, dans la gamme de concentration 0,1 à 1  $\mu\text{g}$ ; 2. Que la réponse du détecteur pour une même quantité injectée variait énormément avec la nature de l'ester d'acide organique analysé. La fig. 6 présente le faisceau de droites exprimant la variation de la réponse

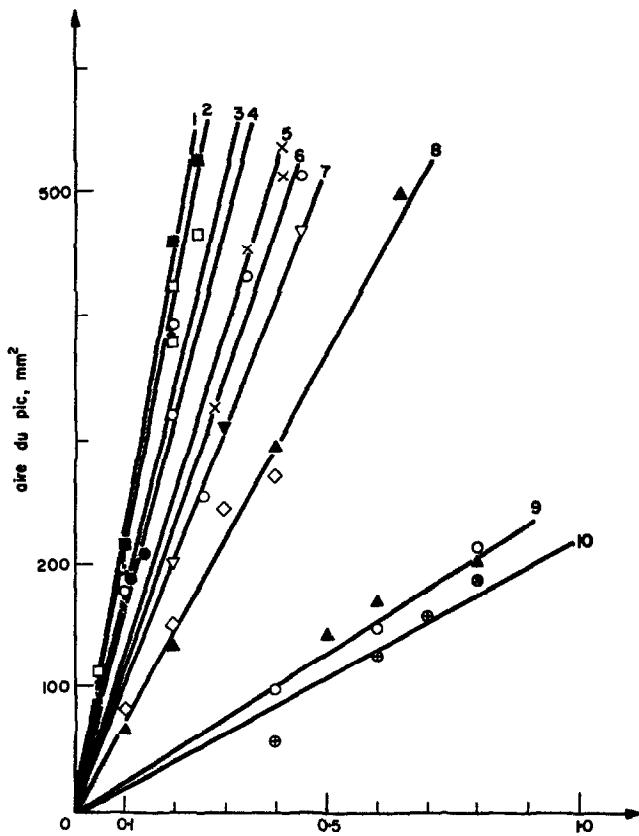


FIG. 6. Réponse quantitative du détecteur à ionisation de flamme pour divers esters méthyliques d'acides organiques.

1: succinate-2: glutarate, malate et fumarate-3: citraconate-4: malonate-5: lactate-6: pyruvate-7: transaconitate-8: glycolate et oxalate-9:  $\alpha$ -cetoglutarate, citrate-10: malate.

du détecteur (mesurée par la surface du pic chromatographique) en fonction des quantités d'esters injectées dans l'appareil. On constate que c'est pour les esters d'acides très oxygénés que le détecteur est le moins sensible, ce qui est en bon accord avec ce que l'on sait des mécanismes de l'ionisation des molécules organiques dans une flamme.

Les analyses quantitatives de mélanges d'acides organiques méthylés ensemble puis chromatographiés en phase gazeuse, doivent tenir compte de la réponse différente du détecteur pour chaque ester. Les surfaces mesurées sont corrigées avec l'aide du graphique comme dans le calcul suivant (Tableau 2):

TABLEAU 2. EXEMPLE D'ANALYSE QUANTITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE D'UN MÉLANGE DE TROIS ESTERS D'ACIDES ORGANIQUES

Esters d'acides organiques	Surface du pic chromatographique (mm <sup>2</sup> )	Surface corrigée	Pourcent. déterminés par chromatographie	Pourcent. calculés d'après les poids d'acides mélanges
Oxalate de méthyle	30	$30 \times \frac{550}{184} = 90$	30	33,3
Malonate de méthyle	70	$70 \times \frac{550}{386} = 100$	33,3	33,3
Succinate de méthyle	110	$110 \times \frac{550}{550} = 110$	36,7	33,3

Le Tableau 3 présentent les résultats d'analyse de deux mélanges types. On constate que l'accord est satisfaisant entre les pourcentages déterminés par chromatographie et les pourcentages calculés d'après les poids des acides organiques mélangés. L'estimation des quantités absolues d'acides soumis à la méthylation a été faite dans le cas du mélange citrate-malate en injectant sur la colonne des quantités connues d'esters témoins, immédiatement après les analyses. Les résultats obtenus montrent que la méthylation peut être considérée comme totale et que l'élation hors de la colonne est quasi-complète. Les dosages par chromatographie en phase gazeuse semblent cependant, pour les deux acides lourds (malique, citrique), légèrement incorrects par défaut.

TABLEAU 3. ANALYSE QUANTITATIVE DE DEUX MÉLANGES D'ESTERS, H.D'ACIDES ORGANIQUES

Esters	% déterminés par chromatographie			Moyenne	% calculés d'après les poids d'acides mélanges		
	expérience No.						
	1	2	3				
<b>Mélange A</b>							
Lactate	18	16,7	17,4	17,4	18,3		
Pyruvate + glycolate	26,2	26,8	27	26,7	30,3		
Oxalate	49,8	49	49,5	49,4	44,2		
Succinate	6,1	7,6	6,3	7	7,2		
<b>Mélange B</b>							
Malate	30,8	31,5	31	31,1	32		
Citrate	69,2	68,5	69	68,9	68		

*Dosage de l'acide oxalique présent dans les extraits de Chataigner*

Les quantités d'acide oxalique présentes dans les extraits aqueux et alcoolique de cinq grammes de feuilles de chataigner ont été dosées par la soude (0,01 N) lors des chromatographies sur gel de Silice. Le même dosage a été fait par chromatographie en phase gazeuse: pour cela nous avons comparé la surface du pic d'oxalate de méthyle obtenu sur les chromatogrammes des extraits méthylés avec la surface du pic donné par l'injection d'une quantité connue d'oxalate de méthyle témoin. Le Tableau 4 permet la comparaison des résultats fournis par les deux méthodes. L'accord est satisfaisant.

TABLEAU 4. DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE DANS LES FEUILLES DE CHATAIGNER

Extrait	dosage après séparation sur gel de Silice (mg)	Quantité d'acide oxalique pour 5 g de matière fraîche			
		No. 1	No. 2	No. 3	Moyenne
Aqueux	22,5	21,5	26,4	27,4	25,1
Alcoolique	12,25	9,8	11,25	10,2	10,5

### CONCLUSIONS

Pour l'étude des acides organiques des végétaux, la chromatographie en phase gazeuse nous semble constituer une méthode complémentaire intéressante. Les déterminations qualitatives permises par les méthodes classiques peuvent être confirmées aisement par cette technique. Le contrôle des résultats quantitatifs fournis par les dosages classiques est également possible mais il importe d'estimer avant chaque dosage la réponse de détecteur pour des quantités connues d'esters témoins. Cette réponse varie en effet avec les conditions expérimentales (température, débit, réglage de la flamme dans le cas d'un détecteur à ionisation de flamme) et avec la nature de l'ester d'acide organique élué.

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### *Méthylation des acides organiques*

Deux méthodes de méthylation ont été employées. La première consiste à dissoudre les acides dans un excès de méthanol; on ajoute ensuite quelques mg d'*acide paratoluène sulfonique* et la méthylation est réalisée par ébullition douce sous reflux pendant deux heures. La solution est ensuite concentrée sous vide.

La seconde méthode consiste à dissoudre les acides (20 mg) dans un excès (2 ml.) de méthanol contenant du trifluorure de Bore en solution. Nous avons utilisé la solution commerciale fournie par Applied Science Laboratories (125 g BF<sub>3</sub>/l de méthanol). La méthylation est poursuivie pendant une nuit à la température du laboratoire et la solution peut être injectée directement dans le chromatographe. Cette seconde méthode, plus douce que la précédente, nous paraît préférable. C'est celle que nous avons employée pour les analyses quantitatives.

*Extraction des acides organiques des végétaux*

(a) *Acides organiques des pommes.* La méthode d'extraction employée a été décrite en détail par Macheix.<sup>9</sup> 100 g de pulpe sont fixés par l'alcool éthylique bouillant. Après broyage, une première extraction est faite par l'alcool de fixation, ajusté avec de l'eau à 60 °Beumé; le broyat et le solvant sont agités ensemble pendant un quart d'heure. Une deuxième extraction du résidu, à l'eau neutre, complète la précédente. Une troisième extraction du résidu, en présence d'Amberlite IR 120H activée permet d'obtenir un troisième extrait aqueux acide.

Les trois extraits mélangés sont passés successivement sur résine Amberlite IR 120H, puis sur résine Dowex 1 × 8, sous forme acétate. Les acides organiques ont été élus ensemble de cette colonne par l'acide formique 6 N lorsqu'on voulait étudier ces acides par chromatographie en phase gazeuse. L'élution progressive des divers acides par plusieurs solvants — acide acétique 2,5 N, acide acétique 6 N, acide formique 6 N — a été réalisée selon la technique de Hulme.<sup>1</sup>

(b) *Acides organiques des feuilles de Chataigner.* Les feuilles ont été prélevées sur des arbres ayant souffert d'une forte chlorose calcaire. — Fixation et extraction: Les procédés de fixation et extraction des acides organiques sont ceux décrits par Leroux et Mme C. Lessaint.<sup>10</sup> 10 g de feuilles fraîches sont fixés par l'alcool à 95° bouillant. Après broyage on procède à deux extractions alcooliques (une première extraction à l'alcool à 80° et une deuxième avec l'alcool à 60° Beaumé). Une dernière extraction est faite à l'eau permutée additionnée de résine cationique (Dowex 50 sous forme acide). Dans cet extrait aqueux on recueille la fraction des acides organiques présents dans le végétal sous forme de sels insolubles (oxalate de calcium en particulier) qui sont libérés par l'action de la résine. La chromatographie a été faite sur les extraits alcooliques et sur l'extrait aqueux séparément.

Purification des extraits: Les extraits, alcoolique et aqueux, sont passé sur une résine anionique (Amberlite IRA 400 sous forme  $\text{CO}_3^{2-}$ ) qui fixe les acides organiques. Ceux-ci sont élus avec une solution de Carbonate d'ammonium normale. L'éluat est concentré au ballon tournant sous vide et à une température inférieure à 40°C.

Chromatographie: la Chromatographie sur gel de Silice a été réalisée suivant la technique de Bové et Raveux.<sup>2</sup> Les acides organiques sont élus par des mélanges de chloroforme et de Butanol tertiaire saturés par  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , 0,5 N. On utilise 5 mélanges à pourcentage croissant de Butanol (8%–13%–20%–28%–35%). L'effluent est recueilli par fraction de 4 cm.<sup>3</sup>

Le fait de recueillir des fractions de 4 cm<sup>3</sup> au lieu de 2 cm<sup>3</sup> comme cela se fait habituellement ne nuit pas à une bonne séparation des acides (Jolivet, Chargé de recherches INRA — Communication personnelle).

Les acides élus sont titrés par NaOH (0,01 N) en présence de rouge de phénol. Pour chaque pic les fractions correspondantes sont réunies et utilisées pour identifier les acides par chromatographie sur papier ou en couche mince (couche mince de cellulose: poudre de cellulose M N 300 G de Macherey, Nagel & C.). Les réactifs utilisés pour la révélation sont ceux indiqués par Paskova et Munk.<sup>11</sup>

<sup>10</sup> M. L. ROUX, et LESSAINT (Mme C.), *Ann. Physiol. Vég.* 1, 83–91 (1959).

<sup>11</sup> JIRINA PASKOVA et V. MUNK, *J. Chromatog.* 4, 241–243 (1960).