

CHROM. 7559

**Note**

## Analyse quantitative des acides phénoliques par chromatographie de partage sur gel de silice

J. F. MOROT-GAUDRY, M. Z. NICOL et E. JOLIVET

*Laboratoire du Métabolisme Intermédiaire, Département de Physiologie Végétale, I.N.R.A., 78000-Versailles (France)*

(Reçu le 2 mai 1974)

Les acides phénoliques sont très répandus dans le règne végétal. Ils interviennent notamment dans la composition des tanins<sup>1</sup>, des coumarines<sup>2</sup> et des flavonoïdes<sup>3</sup> et comme intermédiaires dans la biosynthèse de la lignine<sup>1-4,5</sup>. Leur accumulation est constatée dans le cas de réponses des plantes à des blessures causées aussi bien par des agents pathogènes<sup>6-8</sup> que par des facteurs mécaniques<sup>9,10</sup>. Ils sont les substrats des polyphénoloxydases<sup>11-13</sup>. Ils sont impliqués aussi dans le brunissement non enzymatique de la pomme de terre<sup>14</sup>, et passent pour être des régulateurs de la germination<sup>15-17</sup> et de la croissance<sup>18-21</sup>.

Aussi leur étude présente-t-elle une grande importance, et il est donc indispensable d'avoir à sa disposition des techniques qui permettent de les séparer et de les doser avec précision et reproductibilité.

Actuellement leur analyse quantitative se fait le plus souvent, après séparation sur papier ou sur couches minces, soit par photométrie directe<sup>16,22</sup>, soit par spectro-photométrie<sup>8,17,23-31</sup> après élution des chromatogrammes. Ce sont des méthodes longues, laborieuses et très délicates. C'est pourquoi, compte-tenu d'une part de l'existence d'autres possibilités d'analyses quantitatives telle que la chromatographie de partage sur colonne de gel de silice<sup>32,33</sup>, et compte-tenu d'autre part des progrès récemment réalisés dans le domaine de la chimie analytique, nous avons essayé d'appliquer notre technique de séparation des acides organiques sur colonne de gel de silice<sup>34</sup> à la séparation des acides phénoliques.

La présente note rapporte les résultats des travaux que nous avons réalisés pour séparer avec efficacité et reproductibilité, les acides phénoliques rencontrés le plus fréquemment dans les tissus végétaux.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### *Principe*

Les acides phénoliques sont séparés automatiquement par chromatographie de partage, sur colonne de gel de silice, en utilisant pour leur élution, une série de solvants à base de chloroforme et de cyclohexane, enrichis progressivement en alcool amylique tertiaire. Leur dosage est effectué à la sortie de la colonne, par spectrophot-

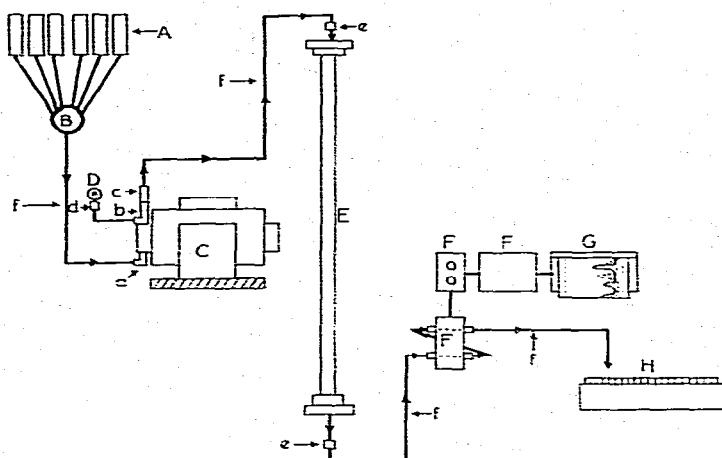


Fig. 1. Schéma de l'appareillage utilisé pour la séparation et le dosage des acides phénoliques. (A) Chambres pour mélanges éluants; (B) tête de distribution à 6 voies (Chromatronics, Berkeley, Calif., É.U.); (C) pompe doseuse (Dosapro-Milton-Roy, Paris, France; Modèle 196-31 avec joint en viton); (D) manomètre (Blondelle, Paris, France); (E) colonne à chromatographie (Chromatronics; Modèle L.C. -9, MA-29); (F) photomètre (ISCO) Lincoln, Neb., É.U.; Modèle UA-4, système optique Type 5, channel alternator) avec cellules à flux continu ( $25 \mu\text{l}$  de volume et 5 mm de trajet optique); (G) enregistreur; (H) collecteur de fractions avec détecteur de pic. (a) Raccord coudé (Swagelok, Cleveland, Ohio, É.U.: Modèle 200-2-2); (b) raccord en té (Swagelok, Modèle 200-3-T.T.M.); (c) tube adaptateur (Chromatronics, Modèle 107-A-20); (d) raccord coudé (Swagelok, Modèle 200-8-2); (e) raccord en polypropylène (Chromatronics, Modèle TEF 107 et 107 A3); (f) tubes PTFE (Chromatronics, Modèles T06 30 31 et T125 063).

métrie d'absorption à 254 nm et 313 nm<sup>35</sup>. Le schéma général de l'appareillage est représenté sur la Fig. 1.

#### *Préparation de la colonne de gel de silice*

Une quantité déterminée (17 g) de silice Mallinckrodt (St. Louis, Mo., É.U.) (100 mesh), séchée au préalable à 110°, est introduite dans un erlenmeyer (100 ml). Elle est humidifiée progressivement par une solution aqueuse (10 ml) d'acide sulfurique 0.5 N, ajoutée goutte à goutte, par fractions de 1 ml. Après addition de chaque fraction de 1 ml, la silice est triturée à l'aide d'une baguette de verre, de façon à obtenir une poudre homogène qui ne colle pas aux parois de l'erlenmeyer. Ensuite la silice est reprise par un mélange (60 ml) de chloroforme-cyclohexane (50:50), et la suspension ainsi obtenue est transvasée dans un tube à chromatographie bien sec (diamètre 9 mm, hauteur utile 420 mm). Le dépôt homogène de la silice dans le tube est obtenu, sous une faible pression, en soumettant le tube à chromatographie à un mouvement automatique semi-circulaire.

#### *Introduction, sur la colonne de gel de silice, de la solution d'acides phénoliques à séparer*

L'échantillon d'acides phénoliques (E. Merck, Darmstadt, R.F.A. ou Fluka, Buchs, Suisse), préalablement amené à sec sous air comprimé, est repris par 0.5 ml d'acide sulfurique 5 N et 1 g de silice, puis déposé au sommet de la colonne de gel de silice, à l'aide de quelques ml du mélange chloroforme-cyclohexane (50:50).

### *Élution des acides phénoliques fixés sur la colonne de gel de silice*

L'élution est faite par emploi d'une série de solvants organiques, de polarité croissante, choisis automatiquement par un système de vannes à 6 voies (Fig. 1), et envoyés à débit constant (180 ml/h) au sommet de la colonne de gel de silice. La composition et le volume des mélanges éluants utilisés sont les suivants:

Mélange I (150 ml) à 0.3 % d'alcool amylique tertiaire dans un mélange chloroforme-cyclohexane (50:50).

Mélange II (300 ml) à 0.8 % d'alcool amylique tertiaire dans un mélange chloroforme-cyclohexane (50:50).

Mélange III (250 ml) à 3 % d'alcool amylique tertiaire dans un mélange chloroforme-cyclohexane (50:50).

Mélange IV (250 ml) à 8 % d'alcool amylique tertiaire dans un mélange chloroforme-cyclohexane (50:50).

Mélange V (250 ml) à 22 % d'alcool amylique tertiaire dans un mélange chloroforme-cyclohexane (50:50).

Avant emploi, chaque mélange est agité dans une ampoule à décantation, en présence d'un volume d'acide sulfurique 0.5 N, égal au 1/10 du volume du mélange. Après séparation des deux phases, la phase organique utile est recueillie et filtrée sur papier.

### *Dosage des acides phénoliques à la sortie de la colonne de gel de silice*

À la sortie de la colonne de gel de silice, l'absorption de l'effluent est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre, à 254 et 313 nm, longueurs d'onde caractéristiques des spectres d'absorption des acides phénoliques<sup>35</sup>. Après enregistrement des mesures, les surfaces des pics obtenus, sont mesurées par planimétrie, puis comparées à des surfaces témoins obtenues pour des quantités connues d'acides phénoliques.

En outre, les éluats recueillis sur un collecteur de fractions, peuvent être chromatographiés sur papier ou sur couches minces, pour contrôler la nature présumée des acides phénoliques contenus dans les différents pics d'élution.

## RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Une analyse réalisée à partir d'un mélange synthétique (Fig. 2) montre que les acides suivants: cinnamique, férulique (3-méthoxy-4-hydroxycinnamique), vanillique (3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque), *p*-coumarique (4-hydroxycinnamique), gentisique (2,5-dihydroxybenzoïque), cafétique (3,4-dihydroxycinnamique), protocatéchique (3,4-dihydroxybenzoïque), gallique (3,4,5-trihydroxybenzoïque), chlorogénique (caféyl-3-quinique) sont séparés complètement.

Cette méthode permet de séparer les principaux acides phénoliques rencontrés le plus fréquemment dans le matériel végétal. C'est une méthode très fine qui décèle jusqu'à 0.1 µéquiv. d'acide. Elle est reproductible, rapide (7 h) et d'emploi facile. De cette façon, il devient possible de déterminer avec une plus grande facilité et une plus grande certitude, la nature des acides phénoliques des végétaux, et ainsi de mieux interpréter les voies du métabolisme liées à ces acides et donc de comprendre mieux le rôle physiologique de ces substances.

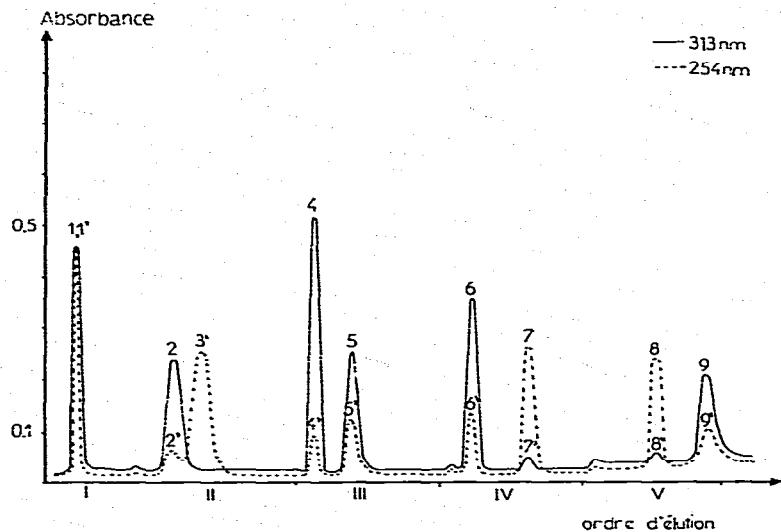


Fig. 2. Courbe de séparation des acides phénoliques à partir d'un mélange synthétique. 1,1' = Acide cinnamique; 2,2' = acide férulique (3 méthoxy-4-hydroxycinnamique); 3,3' = acide vanillique (3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque); 4,4' = acide *p*-coumarique (4-hydroxycinnamique); 5,5' = acide gentisique (2,5-dihydroxybenzoïque); 6,6' = acide caféïque (3,4-dihydroxycinnamique); 7,7' = acide protocatechique (3,4-dihydroxybenzoïque); 8,8' = acide gallique (3,4,5-trihydroxybenzoïque); 9,9' = acide chlorogénique (caféyl-3-quinique). I à V = Mélanges éluants.

#### REMERCIEMENTS

Cette étude est le prolongement d'un travail antérieur effectué sur la séparation automatisée des acides organiques sur colonne de gel de silice<sup>34</sup>, travail qui a fait l'objet d'une aide financée de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (convention No. D.G.R.S.T. 73.7.1523).

Nous adressons d'autre part nos remerciements à Monsieur J. C. Huet (Laboratoire des Protéines et des Acides Aminés, C.N.R.A., Versailles) pour les nombreux conseils qu'il nous a donnés dans le domaine technologique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. A. Brown, dans J. B. Harborne (Rédacteur), *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, New York, 1964, p. 361.
- 2 A. C. Neish, dans J. B. Harborne (Rédacteur), *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, New York, 1964, p. 323.
- 3 A. C. Neish, dans J. B. Harborne (Rédacteur), *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, New York, 1964, p. 341.
- 4 F. A. Isherwood, dans J. B. Pridham (Rédacteur), *Phenolics in Plants in Health and Disease*, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1960, p. 57.
- 5 G. H. N. Towers et W. S. G. Maass, *Phytochemistry*, 4 (1965) 57.
- 6 C. Martin, *Thèse Doct. (État) Sci. Nat.*, Paris, 1958.
- 7 I. A. M. Cruickshank et D. R. Perrin, dans J. B. Harborne (Rédacteur), *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, New York, 1964, p. 511.
- 8 J. Tanguy, *Thèse Doct. (État) Sci. Nat.*, Paris, 1970.
- 9 G. Johnson et L. A. Schall, *Science*, 115 (1952) 627.
- 10 T. Akazawa, I. Uritani et H. Kubata, *Arch. Biochem. Biophys.*, 88 (1960) 150.

- 11 J. Koukol et E. E. Conn, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2692.
- 12 A. C. Neish, *Phytochemistry*, 1 (1961) 1.
- 13 K. R. Hanson et E. A. Havir, *Recent Advan. Phytochem.*, 4 (1972) 45.
- 14 R. C. Cheng et F. Hanning, *Food Res.*, 20 (1955) 506.
- 15 M. Evenari, *Bot. Rev.*, 15 (1949) 153.
- 16 J. R. Hennequin et C. Juste, *Ann. Agron.*, 18 (1967) 545.
- 17 C. F. van Sumere, J. Cottenie, J. de Greef et J. Kint, *Recent Advan. Phytochem.*, 4 (1972) 1965.
- 18 J. P. Nitsch et C. Nitsch, *Ann. Physiol. Vég.*, 4 (1962) 211.
- 19 T. T. Lee et F. Skoog, *Physiol. Plant.*, 18 (1965) 386.
- 20 W. D. Guenzi et T. M. McCalla, *Agron. J.*, 58 (1966) 303.
- 21 T. S. C. Wang, Tze-Ken Yang et Tze-Tang Chuang, *Soil. Sci.*, 103 (1967) 239.
- 22 M. Metch, F. Jacquin, Oh. Nguyen et E. Uiron, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1962) 1763.
- 23 R. W. Keith, D. le Tourneau et D. Mahlum, *J. Chromatogr.*, 1 (1958) 534.
- 24 D. R. Mc Calla et A. C. Neish, *Can. J. Biochem.*, 37 (1959) 537.
- 25 C. F. van Sumere, H. Teuchy et F. Parmentier, *J. Chromatogr.*, 6 (1961) 481.
- 26 C. F. van Sumere, F. Parmentier et H. Teuchy, *J. Chromatogr.*, 6 (1961) 484.
- 27 V. C. Runeckles, *Can. J. Biochem.*, 41 (1963) 2259.
- 28 S. Z. El-Basyouni et G. H. N. Towers, *Can. J. Biochem.*, 42 (1964) 203.
- 29 H. Morita, *Can. J. Biochem.*, 43 (1965) 1277.
- 30 J. J. Macheix, *C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. D*, 264 (1967) 3010.
- 31 A. W. Feldman et R. W. Hanks, *Phytochemistry*, 7 (1968) 5.
- 32 E. Sondheimer, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74 (1958) 131.
- 33 K. R. Hanson et M. Zucker, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 1105.
- 34 J. F. Morot-Gaudry, M. Z. Nicol et E. Jolivet, *J. Chromatogr.*, 87 (1973) 425.
- 35 G. Alibert, *J. Chromatogr.*, 80 (1973) 173.