

PHYTOCHIMIE. — *Sur la formation d'un complexe « depside-caféine » lors de la conservation, au froid, en milieu hydro-éthanolique, d'échantillons foliaires de caféiers. Implications méthodologiques pour l'extraction des depsides.* Note (\*) de **Jean-Paul Colonna**, présentée par M. Roger Gautheret.

Après fixation à l'éthanol bouillant puis conservation au froid à  $-25^{\circ}\text{C}$ , en milieu hydro-éthanolique, les depsides présents dans les feuilles de caféiers n'apparaissent pas à l'extraction par l'éthanol fort. Le complexe qu'ils forment avec la caféine les masque. Un traitement au chloroforme rompt le complexe et les fait réapparaître, il est possible alors de les doser dans leur totalité. Le complexe correspond à un « artefact » de conservation au froid; il ne peut exister en quantité importante dans les tissus vivants; il se forme aussi bien avec l'acide chlorogénique qu'avec ses isomères.

*The depsides present in coffee leaves are not apparent upon extraction with ethanol if the plant material has been fixed in boiling ethanol then maintained at  $-25^{\circ}\text{C}$ . A complex formed with caféin prevents the extraction and this artefact from cold conservation concerns chlorogenic acid and its isomers. A treatment with chloroform can break the complex and allows the depsides to be dosed. The complex does not seem to exist in living tissues.*

J'ai traité précédemment <sup>(1)</sup> d'une méthode de séparation et de dosage des depsides caféyl-quiniques chez le caféier, après fixation à l'azote liquide puis lyophilisation du matériel végétal. L'impossibilité d'utiliser ce dernier procédé d'une façon constante m'a conduit à le remplacer par une stabilisation à l'éthanol bouillant [<sup>(2)</sup>, <sup>(3)</sup>]. De plus, la nécessité de répartir dans le temps le traitement de divers échantillons récoltés au même moment m'imposait de conserver ces échantillons à  $-25^{\circ}\text{C}$ , durant plusieurs semaines. Or, le froid favorise <sup>(4)</sup> l'apparition du complexe entre l'acide chlorogénique et la caféine [<sup>(5)</sup>, <sup>(6)</sup>]. Il importait donc de vérifier que l'éventuelle formation de ce dérivé de condensation n'empêchait pas l'extraction et la détermination quantitative des depsides.

PREUVES DE LA FORMATION DU COMPLEXE. — *Présence des depsides et de la caféine à l'état non combiné chez le caféier.* — La découverte et l'étude des depsides de l'acide quinique sont liées au café <sup>(7)</sup>; la plupart des espèces du genre *Coffea* en contiennent. Il en est de même de la caféine, sauf pour la section *Mascarocoffea* <sup>(8)</sup>. Pour les caféiers *robusta* et *excelsa*, j'ai constaté que l'éthanol fort dans lequel le complexe n'est pas soluble, extrait la quasi totalité de l'acide chlorogénique et de la caféine présents, aussi bien du matériel végétal « tel quel » que lyophilisé <sup>(1)</sup>. La plus grande partie de l'acide chlorogénique des grains et des feuilles vivants ne serait donc pas liée à la base purique.

*Absence apparente de depsides, après fixation à l'éthanol bouillant et conservation à  $-25^{\circ}\text{C}$ .* — A la suite d'une expérience portant sur de jeunes plants de caféiers, j'ai constitué puis fixé à l'éthanol bouillant quinze échantillons de feuilles. Après six mois de conservation au congélateur à  $-25^{\circ}\text{C}$ , broyage, prélèvement d'une aliquote du broyat et extraction, l'analyse ne révélait aucune trace de depsides pour ces échantillons. Le procédé d'extraction utilisé <sup>(1)</sup> faisait intervenir l'éthanol fort puis l'éther de pétrole pour la dépigmentation et la purification partielle. Sur ce même matériel végétal, récemment stabilisé à l'azote liquide, il permettait de mettre en évidence d'importantes quantités de depsides. Les depsides existaient donc bien dans ce matériel, mais se trouvaient masqués à la suite de cette longue période de conservation à  $-25^{\circ}\text{C}$ . La formation du complexe durant ce laps de temps et l'incapacité du solvant à l'extraire, constituaient la première explication possible de ce phénomène.

22 SEP. 1977  
O. R. S. T. O. M. ex 1  
Collection de Référence  
n° 8769 B. B. V.

*Rupture du complexe par le chloroforme et réapparition des depsides.* — Pour retrouver les depsides éventuellement masqués comme constituants du complexe, il faut rompre ce dernier. Celui-ci se défait lorsque le pH s'élève <sup>(9)</sup>, mais diverses dégradations interviennent <sup>(10)</sup>. Il peut alors s'extraire par l'éthanol moins fort ou par l'eau, sans séparation des constituants. Par contre, la relative faiblesse des forces qui unissent le depside à la base purique <sup>(11)</sup> laisse supposer qu'un solvant pour lequel les deux constituants présenteraient des différences de solubilité marquées permettrait de les séparer. Le chloroforme remplit ces conditions. Le traitement de l'échantillon au chloroforme fait, effectivement réapparaître les depsides masqués : c'est une preuve indirecte mais indiscutable de la formation du complexe.

TABLEAU

*Quantités de depsides mises en évidence sur divers échantillons de feuilles de caféiers, fixés à l'éthanol bouillant et conservés durant 6 mois à -25°C (I, avant rupture du complexe « depside-caféine »; II, après rupture du complexe par traitement au chloroforme).*

Échantillons	Quantités de depsides en milligrammes					
	Acide chlorogénique		Acide néochlorogénique		Acide cryptochlorogénique	
	I	II	I	II	I	II
1	0	44,0	0	5,1	0	5,7
2	0	29,9	0	4,3	0	4,3
3	0	12,4	0	0,9	0	1,2
4	0	30,4	0	3,5	0	4,6
5	0	62,8	0	5,1	0	8,5
6	0	37,6	0	4,6	0	5,6
7	0	17,2	0	1,1	0	1,5
8	0	52,2	0	4,4	0	6,8
9	0	35,0	0	6,0	0	6,7
10	0	30,4	0	3,0	0	4,4
11	0	22,2	0	2,6	0	4,0
12	0	45,2	0	5,1	0	4,9
13	0	32,3	0	3,5	0	5,3
14	0	34,5	0	3,6	0	5,6
15	0	40,0	0	4,8		6,7

*APPLICATIONS.* — Reprenant de nouvelles aliquotes des quinze échantillons mentionnés ci-dessus, j'ai traité par le chloroforme, aussi bien l'éthanol de fixation évaporé à sec, que la poudre homogène constituant la partie solide du broyat. Après centrifugation, lavage du chloroforme et récupération des eaux de lavages, l'épuisement de la poudre se poursuit par l'éthanol et le méthanol en présence d'eau. L'évaporation à sec de l'ensemble des liqueurs d'extraction, sauf le chloroforme, permet d'obtenir un extrait final dans 5 ml d'éthanol à 50° GL. Les quinze extraits, correspondant aux aliquotes de chacun des échantillons précédents, contiennent tous des quantités notables d'acides chlorogénique, cryptochlorogénique et néochlorogénique : le traitement au chloroforme a entraîné la réapparition des depsides, qui étaient bien retenus dans le complexe (tableau).

*DISCUSSION.* — *Extraction par l'éthanol de fixation; le complexe en tant qu'« artefact ».* — Après stabilisation au froid et lyophilisation, le dosage des depsides caféyl-quiniques

du caféier ne nécessite aucun traitement d'extraction tendant à rompre le complexe; il en est de même, après fixation très récente à l'éthanol bouillant comme je l'ai vérifié sur *C. arabica*. A la suite d'une stabilisation à l'éthanol bouillant et longue conservation à  $-25^{\circ}\text{C}$ , ces composés semblent disparaître: le complexe se forme; un tel traitement devient obligatoire. De plus, dans ce dernier cas, l'éthanol de fixation maintenu durant une longue période en contact avec la poudre végétale extrait à peu près entièrement les depsides et la caféine. Ceci ne se produit pas s'il n'y a pas longue conservation au froid, mais explique la disparition apparente totale des depsides et de la caféine, qui peuvent alors se complexer. Le complexe apparaît bien comme un « artefact » de conservation au froid.

*Existence du complexe dans les tissus vivants.* — La réponse à cette question, affirmative pour certains [(<sup>4</sup>), (<sup>12</sup>)], est parfois négative (<sup>13</sup>) ou en tout cas restrictive (<sup>6</sup>). On a pu calculer (<sup>6</sup>) que, pour le caféier *robusta*, 78 % de la base purique et 43 % de l'acide chlorogénique pourraient se lier, en cas de libre accessibilité réciproque. Les résultats obtenus ici plaident pour la non existence du complexe dans les tissus vivants: si il y existe, ce ne peut être qu'en faible quantité.

*Formation du complexe avec les isomères de l'acide chlorogénique.* — L'ion quinate n'intervient que faiblement dans la liaison avec la base purique, l'association étant le fait de l'ion caféate (<sup>11</sup>). L'acide chlorogénique, ses isomères et l'acide caféique présenteraient, en réalité, des capacités du même ordre à se complexer avec la base purique (<sup>6</sup>). Une forme cristallisée d'un complexe entre une molécule de caféine et une molécule d'acide néochlorogénique a d'ailleurs pu être obtenue (<sup>14</sup>). De plus, la détermination des constantes d'association prouve que les ions m-coumarate, 3-4 méthoxycinnamate et même cinnamate jouent, à un degré moindre, le même rôle que les ions caféate ou chlorogénate (<sup>11</sup>). L'absence apparente des divers depsides, après fixation à l'éthanol bouillant puis conservation à  $-25^{\circ}\text{C}$ , indique que le complexe concerne, non seulement l'acide caféyl-3 quinique, mais aussi ces isomères.

*Proportions de depsides masqués.* — On peut s'étonner qu'après fixation à chaud et longue conservation à  $-25^{\circ}\text{C}$ , aucune trace de depsides ne soit décelée à l'analyse, lorsque l'extraction ne comporte pas de traitement ayant pour but de rompre le complexe. Cela signifierait que celui-ci intéresse les depsides caféyl-quiniques dans leur totalité. Compte tenu des rapports depsides/caféine chez le caféier, la conjugaison de forces correspondant à plusieurs possibilités de condensation doivent alors intervenir: entre depsides, entre depsides et caféine dans les proportions 1/1 et 2/1 (<sup>11</sup>); un effet d'entraînement par la précipitation de la caféine au froid peut exister.

**IMPLICATIONS MÉTHODOLOGIQUES.** — Elles concernent la procédure d'extraction. Après fixation à l'éthanol bouillant et conservation à  $-25^{\circ}\text{C}$ , de matériel végétal provenant de caféiers autres que ceux de la section *Mascarocoffea*, il convient, pour en extraire la totalité des depsides caféyl-quiniques, de rompre le complexe « depside-caféine » par un traitement au chloroforme.

(\*) Séance du 21 février 1977.

(<sup>1</sup>) J. P. COLONNA, *Comptes rendus*, 269, série D, 1969, 1770-1773.

(<sup>2</sup>) J. LOCHE, *Thèse de Docteur Ingénieur*, Toulouse, 1966.

(<sup>3</sup>) H. RUCKENBROD, *Planta*, 46, 1954, 19-45.

- (<sup>4</sup>) R. R. PARIS et M. NISHIO, *Comptes rendus*, 270, série D, 1970, 1465-1467.  
(<sup>5</sup>) A. PAYEN, *Précis de Chimie Industrielle*, Hachette éd., 1851, p. 569.  
(<sup>6</sup>) E. SONDEHEIMER, *Bot. Rev.*, V. 30, n° 4, 1964, 667-712.  
(<sup>7</sup>) J. P. COLONNA, *Cah. Orstom, sér. Biol.*, 13, 1970, 3-24.  
(<sup>8</sup>) A. CHEVALIER, *Les Caféiers du Globe*, III, P. Lechevalier, éd., Paris, 1947.  
(<sup>9</sup>) E. SONDEHEIMER, F. COVITZ et M. J. MARQUISEE, *Arch. Biochem. et Biophys.*, 93, 1961, 63-71.  
(<sup>10</sup>) P. RIBEREAU-GAYON, *Les composés phénoliques des végétaux*, Dunod éd., Paris, 1968.  
(<sup>11</sup>) L. HORMAN et R. VIANI, *ASIC, 5<sup>e</sup> Coll. Int. sur la Chim. des cafés*, Lisbonne, 1971, 102-111.  
(<sup>12</sup>) R. R. PARIS et M. JACQUEMIN, *Ann. Pharm. Fr.*, 1966, 24, n° 12, 741-743.  
(<sup>13</sup>) A. EL HAMIDI et H. WANNER, *Planta*, 61 (1), 1964, 90-96.  
(<sup>14</sup>) M. L. SCARPATI et P. ESPOSITO, *Tetrahedron Letters*, 18, 1963, 1147-1150.

Centre de Physiologie Végétale,  
Université Paul Sabatier,  
118, route de Narbonne,  
31077 Toulouse Cedex, France.