

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Sur une méthode de séparation et de dosage des acides mono-caféoyl-D-quiniques du caféier. Applications.* Note (*) de M. Jean-Paul Colonna, présentée par M. Roger Gautheret.

La chromatographie bidimensionnelle sur papier permet de séparer l'acide 3-0-caféoyl-D-quinique de ses isomères et des autres depsides présents dans les extraits de caféier. Le dosage s'effectue, après élution, par spectrophotométrie dans l'ultraviolet, à 328 m μ . Une diminution de l'acide chlorogénique intervient au début de la germination. Les acides 4-0 et 5-0-caféoyl-quiniques peuvent aussi être dosés par cette méthode. Les proportions relatives des trois isomères ne sont pas identiques dans les différents organes du caféier.

Le grain vert de café *Robusta* contient plusieurs depsides de l'acide quinique. Parmi eux, figurent les trois esters 3-0⁽¹⁾, 4-0⁽²⁾ et 5-0-caféoyl-D-quiniques⁽³⁾ connus respectivement sous les noms d'acides chlorogénique, cryptochlorogénique et néochlorogénique. Par ailleurs, un mélange des composés 3-4, 3-5 et 4-5-dicaféoyl-D-quiniques⁽⁴⁾ constituerait, en réalité, la fraction appelée précédemment « acide isochlorogénique »⁽⁵⁾. Enfin, il faut vraisemblablement compter au nombre de ces depsides des esters féruloyl- et para-coumaroyl-quiniques⁽⁶⁾. Toute étude sur l'acide chlorogénique chez le caféier nécessite la mise au point d'une méthode de séparation et de dosage s'appliquant aux divers organes de cette plante.

SÉPARATION ET DOSAGE. — Après fixation par l'azote liquide et lyophilisation, le matériel végétal est extrait, sous azote, en utilisant le dispositif d'Alibert⁽⁷⁾, par le mélange : éthanol à 96° GL-acétate d'éthyle (1-1, v/v), puis par l'éthanol à 96° GL seul. L'extrait total, évaporé à sec, dépigmenté par l'éther de pétrole (PE 35-50), est finalement repris par 2 à 10 ml d'éthanol à 70° GL.

Séparation. — La chromatographie monodimensionnelle sur papier [(8), (9)] avec divers solvants n'a permis qu'une séparation imparfaite des différents isomères. Les meilleurs résultats furent obtenus en chromatographie bidimensionnelle, avec le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (4-1-5, v/v), utilisé à front perdu, sur papier Whatman n° 3 préalablement imprégné de tampon phosphate 0,067 M de pH 7,5 (BAEt)⁽¹⁰⁾. La seconde migration est réalisée au moyen du solvant méthyl-isobutyl-cétone-acide formique-eau (3-1-2, v/v) (MFE)⁽¹¹⁾. A 20 °C, après équilibration de 18 h, les temps de migration atteignent respectivement 14 et 6 h ; ils peuvent être augmentés pour parfaire la séparation des composés *b* et *c*.

La zone du chromatogramme que nous prendrons en considération comporte en effet quatre taches principales ; la tache *c* correspond à l'acide chlorogénique ; on l'identifie par rapport à un témoin du commerce (Fluka), par sa fluorescence bleu pâle en lumière de 350 m μ et par son spectre d'absorption dans l'ultraviolet. Deux autres composés (spots *a* et *b*) présentent les mêmes caractéristiques (fig. 1), mais des R_f inférieurs ; en comparant ces R_f avec les résultats d'autres auteurs [(10), (11), (12)], on peut identifier ces corps aux acides néochlorogénique et cryptochlorogénique, présents chez le caféier mais peu étudiés. Le composé *d*, de R_f supérieur à celui de l'acide chlorogénique, n'a pas été identifié pour le moment ; notons que

O. R. S. T. O. M.

Collection de Références

n° 73937 ex1

(2)

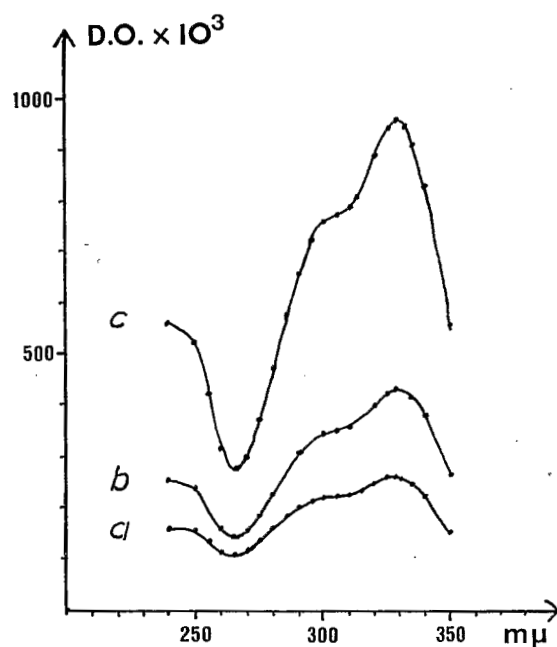


Fig. 1. — Spectres des composés *a*, *b* et *c* (éthanol à 70° GL) dans les proportions approximatives où ils sont présents dans la graine de caféier *Robusta* ; *a*. Acide néochlorogénique ; *b*. Acide cryptochlorogénique ; *c*. Acide chlorogénique.

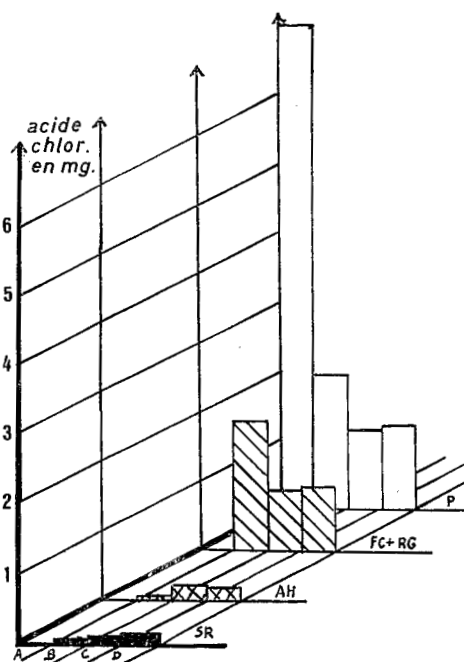


Fig. 2. — Quantités d'acide chlorogénique dans la graine, les plantules ou les organes du caféier *Robusta* au cours des premiers stades de la germination. P: Total par individu (graine ou plantule); FC + RG: Feuilles cotylédonnaires + restant de la graine; AH: Axe hypocotylé; SR: Système radicaire; A, B, C et D: Différents stades considérés.

l'acide « isochlorogénique » du commerce (Fluka) donne plusieurs taches par cette méthode.

Dosage. — Il s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultraviolet, à 328 m μ : 5 à 100 μ l de l'extrait végétal sont déposés sur papier « Whatman n° 3 » tamponné, à l'aide d'une micropipette de Marburg. Après séparation chromatographique, séchage à l'air et découpage de la tache de l'acide chlorogénique repéré en lumière de 350 m μ , on procède à l'élution par l'éthanol à 70° GL, puis on effectue la détermination de la D. O. L'élution par 20 ml d'éthanol à 70° GL est totale si la part de l'acide chlorogénique dans le dépôt initial ne dépasse pas 400 μ g.

Le dosage aboutit à une récupération de l'acide chlorogénique de l'ordre de 84,3 % \pm 3,2. Le déficit est dû principalement à l'apparition de deux composés, migrant, au cours des deux chromatographies successives, avec des R_f faibles. La validité du dosage paraît bien établie entre 0 et 20 μ g/ml. Dans cette zone, un dépôt d'acide chlorogénique témoin ajouté à un dépôt d'extrait végétal se retrouve avec le même taux de récupération.

APPLICATIONS. — *Répartition de l'acide chlorogénique dans les jeunes plantules de caféier Robusta au début de la germination.* — Nous disposons de semences, qui constituent le stade A, et de jeunes plantules de caféiers *Robusta* à trois stades différents. Au stade B la plantule pouvait être divisée en trois parties : 1. Jeune racine (SR) ; 2. Axe hypocotylé chlorophyllien et peu lignifié (AH) ; 3. Feuilles cotylédonnaires non dégagées et indissociables de la graine et de son enveloppe (FC + RG). Le stade C comportait les mêmes trois parties, mais les feuilles cotylédonnaires, verticales, étaient entièrement dégagées de la graine réduite à son enveloppe. Enfin au stade D, les feuilles cotylédonnaires avaient acquis leur position horizontale normale.

La quantité totale d'acide chlorogénique par individu (graine ou plantule) diminue au tout début de la germination (*fig. 2*). La matière sèche évolue de la même façon, mais à un degré moindre. Une stabilisation aussi bien de la masse de matière sèche que de la quantité d'acide se produit lors de l'étalement horizontal des feuilles cotylédonnaires. Au cours de la longue période d'imbibition de la graine, qui précède nécessairement la germination chez le caféier, une perte par exosmose de différents composés et en particulier d'acide chlorogénique est vraisemblable. Dupriez (¹³) l'évalue à 3 %. Or, la diminution enregistrée ici pour ce composé est beaucoup plus importante ; elle laisse supposer une dégradation et une réutilisation interne. Il faut préciser que dans le système racinaire et l'axe hypocotylé les quantités d'acide chlorogénique augmentent en même temps que la matière sèche entre les stades B et D. Les teneurs restent toutefois pour ces organes toujours inférieures à celles des feuilles ou des graines.

Répartition des isomères mono-caféoyl-quiniques dans les organes d'une plantule de caféier Excelsa. — L'analyse a concerné les différents organes d'une plantule de caféier *Excelsa* âgé de huit mois ; les feuilles de rang 4 étant les plus jeunes. Les organes souterrains et l'axe hypocotylé montrent des teneurs en composés mono-

TABLEAU

Teneurs totales et répartition des composés mono-caféoyl-quiniques
dans les organes d'une plantule de caféier *Excelsa*

Désignation des organes	Poids de matière sèche en mg	Teneurs en % de la matière sèche	Pourcentages dans la teneur totale		
			a	b	c
2 feuilles de rang 4	26,2	6,29	8,4	17,5	74,1
2 feuilles de rang 3	254,0	4,09	8,1	11,0	80,9
2 feuilles de rang 2	122,5	4,02	11,2	13,4	75,4
2 feuilles de rang 1	51,4	3,38	11,5	12,1	76,3
2 feuilles cotylédonnaires	98,5	7,87	25,4	26,8	47,8
Tige	47,3	3,23	14,2	21,1	64,7
Axe hypocotylé	101,9	0,83	8,4	12,0	79,5
Racine principale	145,5	0,79	5,1	17,7	77,2
Racines secondaires	149,4	1,37	2,2	4,4	93,4

caféoyl-quiniques inférieures à celles des organes aériens. Il en est de même de la tige par rapport aux feuilles. Dans celles-ci, les teneurs diminuent avec l'âge, sauf pour les feuilles cotylédonnaires qui présentent les teneurs les plus élevées. Cette omniprésence de l'acide chlorogénique et de ses isomères étant établie, il reste à savoir si les différents organes sont capables d'assurer leur biosynthèse ou si un transport peut intervenir.

Les teneurs totales en acides mono-caféoyl-quiniques (tableau) représentent la somme des teneurs de chacun de ces corps. L'examen des pourcentages des trois isomères dans cette somme montre que le composé *a* est toujours présent en quantités inférieures à celles des composés *b* et *c*, ce dernier restant toujours prépondérant. Toutefois ces pourcentages ne sont pas identiques pour les divers organes : ainsi l'acide chlorogénique (*c*), qui correspond à moins de 50 % du total dans les feuilles cotylédonnaires, dépasse 90 % dans les racines secondaires. Ces différences laissent supposer qu'il ne s'agit peut-être pas, dans la plante, d'un simple équilibre chimique entre les trois formes mono-caféoyl-quiniques.

(*) Séance du 13 octobre 1969.

- (1) K. FREUDENBERG, *Ber.*, 53, 1920, p. 232.
- (2) M. L. SCARPATI et P. ESPOSITO, *Tetrahedron letters*, 18, 1963, p. 1147.
- (3) J. CORSE, *Nature*, 172, 1953, p. 771.
- (4) J. CORSE, R. E. LUDIN et A. C. WAISS, *Phytochem.*, 4, 1965, p. 527.
- (5) M. H. BARNES, J. R. FELDMAN et W. V. WHITE, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1950, p. 4178.
- (6) C. LENTNER et F. E. DEATHERAGE, *Chem. Ind.*, 1958, p. 1331.
- (7) G. ALIBERT, *Thèse de spécialité*, Toulouse, 1968.
- (8) M. J. GNAGY, *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, 44, 1961, p. 272.
- (9) J. J. MACHEIX, *Comptes rendus*, 264, Série D, 1967, p. 3010.
- (10) C. MARTIN, *Ann. Phys. Végét.*, 1, 1959, p. 59.
- (11) J. LOCHE, *Thèse de Docteur-Ingénieur*, Toulouse, 1966.
- (12) J. JEAN et W. W. REID, *Chem. Ind.*, 1959, p. 655.
- (13) H. DUPRIEZ, *Agric. Belg.*, 10 (1), 1962, p. 151.

(Office de la Recherche Scientifique et Centre de Physiologie Végétale,
Faculté des Sciences,
118, route de Narbonne, 31-Toulouse, Haute-Garonne.)