

QUELQUES ACIDES PHÉNOLS PARTICULIERS DES FÈVES DE CAFÉIERS SAUVAGES MALGACHES ET AFRICAINS

J.-J. R. RAKOTOMALALA, E. CROS *, A. CHARRIER **

DRAEE-FOFIFA, BP 1444, (101) Antananarivo, Madagascar

* Laboratoire de Chimie-Technologie, CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

** Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM,
BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

INTRODUCTION

L'expression du métabolisme secondaire chez les végétaux peut être considérée comme le résultat d'un processus de différenciation. Ainsi, les composés phénoliques qui constituent l'un des groupes les plus importants et les plus diversifiés des produits secondaires sont-ils étudiés entre autres comme des marqueurs de la diversité biochimique des espèces. Bien que les flavonoïdes soient les plus utilisés (Harborne 1984), les dérivés des acides phénols ont permis par exemple récemment de préciser la classification chez le genre *Vitis* (Boursiquot et al. 1986)

Les études chimiotoxinomiques du sous genre *Coffea* sont limitées malgré le nombre élevé d'espèces connues, et celles incluant les souches sauvages de la région malgache demeurent très fragmentaires. Elles concernent en particulier les lipides (Chassevent et al. 1974), les purines (Ornano et al. 1967, Chassevent et al. 1974, Charrier & Berthaud 1975, Clifford et al. 1991, Rakotomalala et al. 1992), la trigonelline (Ornano et al. 1967), les terpènes (Chassevent et al. 1967) et les acides chlorogéniques (Chassevent et al. 1974, Colonna 1979, Anthony et al. 1989, Clifford et al. 1989a). Cependant, ces études n'ont porté que sur un nombre très limité de caféiers et ne concernent pratiquement que des mesures de teneurs globales.

Afin de préciser la diversité biochimique des caféiers (Rakotomalala 1992), nous avons effectué une analyse systématique des dérivés hydroxycinnamiques des graines de fruits matures de 56 populations de caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea*) et de 14 échantillons représentant 9 espèces africaines (*Eucoffea*).

Nous présentons ici, les résultats concernant la caractérisation de ces composés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal : graines de fruits matures de 56 populations malgaches représentatives des 7 séries botaniques (*Garcinioides*, *Humblotianae*, *Mauritiana*, *Millotii*, *Multiflorae*, *Subterminales*, *Verae*)

définies par Chevalier (1938) et Leroy (1967) et de 14 échantillons représentant 9 espèces africaines (*canephora*, *arabica*, *kapakata*, *liberica*, *congensis*, *racemosa*, *sessiliflora*, *pseudozanguebariae*, *eugenioides*).

Extraction : 1 à 2 g de café vert moulu sont extraits 4 fois successivement par 25 ml d'éthanol 80%, pendant 1 h sous agitation magnétique à température ambiante. Après évaporation de l'alcool, la phase aqueuse est lavée par l'éther de pétrole (40-60) puis extraite par l'acétate d'éthyle selon Fleuriet & Macheix (1972). La phase organique est évaporée à sec et le résidu repris par 10 ml de méthanol et analysé par CLHP.

Hydrolyse alcaline : par l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) selon Clifford (1989b) pendant 5 min (condition ménagée) ou 90 min à température ambiante. Les esters méthyliques obtenus sont analysés par CLHP.

L'hydrolyse classique par NaOH 2N (concentration finale) à température ambiante n'a été employée que rarement, elle conduit en effet à des résultats quantitativement très variables.

Hydrolyse acide : par HCl 2N (concentration finale) à 100°C pendant 1 à 2 h. Réalisée en milieu méthanolique, l'hydrolyse conduit à l'accumulation des esters méthyliques des acides phénols comme dans le cas de l'hydrolyse alcaline.

Analyses chromatographiques : chromatographe Varian 5000, colonne LiChrospher 5 μ m RP18, gradient de 5% à 75% de méthanol dans H₃PO₄ 2mM à 100% de méthanol en 35 min, débit 1 ml min⁻¹, détecteur à barrette de diodes HP 1040A.

Couplage CLHP-SM : chromatographe HP 1050, spectromètre HP 5989A MS engine, interface particule beam, mode EI à 70 eV, station Unix HP 98785. Le gradient linéaire de méthanol dans l'eau est adapté à l'analyse.

Couplage GC-MS : chromatographe HP 5890, colonne OV1, 50 m x 0,25 mm, He 1,5 ml min⁻¹, injecteur 280°C, four de 80°C à 150°C (4°C/min), détecteur HP-MSD 5971, station Unix HP 98785.

Composés témoins :

Esters quiniques : acides chlorogénique et dicaféylquinique, acide férulyl-5-quinique, monoesters quiniques de l'acide p-coumarique (isolés de la pomme par A. Fleuriet).

Acides libres : caféique, férulique, isoférulique, cis et trans o-coumarique, p-coumarique, cinnamique, sinapique, 4-méthoxycinnamique, 3,4,5-triméthoxycinnamique, etc ...

Esters méthyliques : férulate, cinnamate, caféate. Les autres esters ont été préparés par estérification en milieu acide dans le méthanol.

Autres : coumarine, acide trans 2- β -glucosyloxycinnamique.

RESULTATS

Caféiers cultivés

Les profils chromatographiques de *C. canephora* déterminés à 280 et 324 nm (fig 1) sont tout à fait représentatifs, en ce qui concerne les composés majeurs, de ceux obtenus avec les caféiers originaires du continent africain. Sur les 18 composés caractérisés, 9 représentent plus de 90% (aire) du mélange.

Composés identifiés

L'acide caféyl-5-quinique (acide chlorogénique - pic 3) est le composé le plus important du mélange (35 à 55% de l'aire totale). Les acides caféyl-3-quinique (pic 1) et caféyl-4-quinique (pic 2) ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention et de leurs spectres UV avec les isomères obtenus par transestérification (TMAH) de l'acide chlorogénique.

Les acides férulyl-5-quinique (pic 5), dicaféyl-3,4-quinique (pic 6), dicaféyl-3,5-quinique (pic 7) et dicaféyl-4,5-quinique (pic 8) ont été identifiés par comparaison (tr, UV) avec des composés témoins.

Le caféyltryptophane (pic 9) a été caractérisé à partir des données chromatographiques et spectrales décrites par Morishita et al. (1987).

Composés présumés

C. canephora : par analogie avec les résultats de Morishita et al. (1986) et de Trugo & Macrae (1984), et par la similarité de leurs spectres UV avec celui de l'acide férulique, les pics A et C ont été respectivement attribués aux acides férulyl-3-quinique et férulyl-4-quinique. Les pics F, G et I sont supposés correspondre aux acides cafeoyl-féruloyl-quinique et avec beaucoup de réserve H pourrait correspondre au caféoyltryptophane.

C. arabica : le pic C de même temps de rétention que chez *C. canephora* présente un profil spectral identique à celui de l'acide p-coumarylquinique. Par comparaison avec des extraits de pomme, le pic C a été attribué à l'acide p-coumaryl-5-quinique.

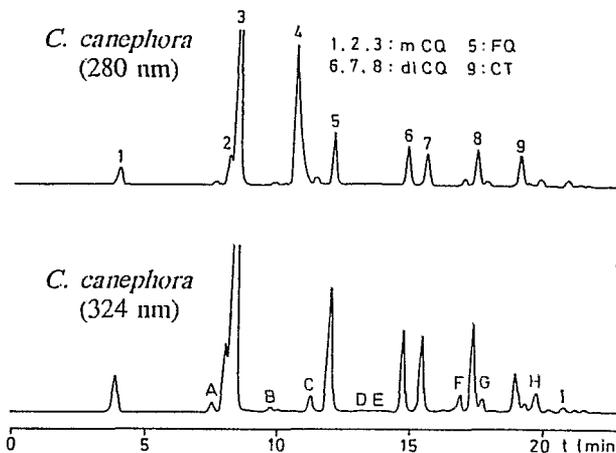


Fig. 1 - Profil chromatographique de l'extrait phénolique brut de *C. canephora* (identification dans le texte).

Caféiers sauvages malgaches et africains

Les caféiers malgaches analysés présentent dans l'ensemble des profils chromatographiques très diversifiés et souvent très complexes (fig. 2). L'analyse des spectres UV montre qu'un pic même symétrique correspond fréquemment à un mélange de composés. L'analyse de la fraction phénolique après hydrolyse acide ou alcaline (fig. 3) permet de mettre en évidence la présence d'acides phénols autres que les acides caféique et férulique décrits dans la littérature (Poisson 1977, Van der Stegen & Van Djuin 1980, Clifford 1985, Clifford et al. 1989a). L'acide chlorogénique est présent dans tous les échantillons alors que nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de dérivés féruliques dans une dizaine de populations.

Acide p-coumarique

Les dérivés de l'acide p-coumarique ont été identifiés tels quels ou caractérisés par la formation de l'ester méthylique correspondant après hydrolyse alcaline.

L'acide p-coumaryl-5-quinique est le composé majeur (fig. 4) de *C. tsirananae* (comparaison avec les isomères des acides p-coumaryl-quiniques extraits de la pomme, accumulation de p-coumarate de méthyle après hydrolyse acide en milieu méthanolique ou alcaline par le TMHA).

Largement distribué chez *Mascarocoffea*, mais généralement en faible quantité, ce composé est accompagné de ses isomères 3- et 4-quinique, très difficiles à mettre en évidence de part la complexité des chromatogrammes.

Acide sinapique

La présence de dérivés sinapiques n'a été confirmée qu'indirectement par identification du sinapate de méthyle après hydrolyse (H⁺/MeOH, TMHA). Cet ester dont le profil spectral UV est facilement repérable (fig 5) a été caractérisé chez de nombreuses populations, mais nous n'avons jamais pu mettre en évidence les esters sinapiques initialement présents dans l'extrait phénolique brut.

Acide 4-méthoxycinnamique

L'ester méthylique de cet acide a été mis en évidence par couplage GC-MS de l'hydrolysate (TMAH) de

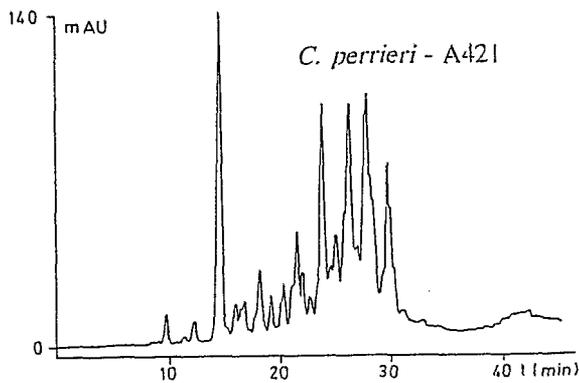


Fig. 2 - Profil chromatographique de l'extrait phénolique brut de *C. perrieri* A421.

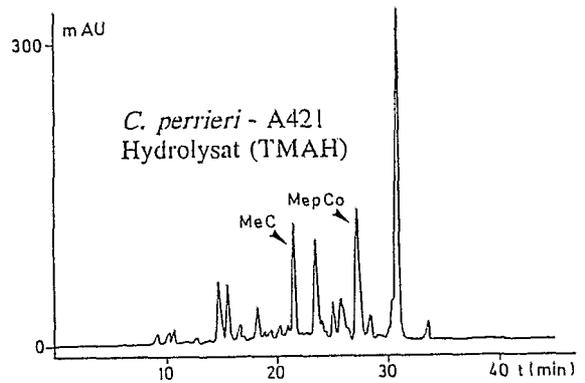


Fig. 3 - Profil chromatographique de l'extrait de A421 après hydrolyse (TMAH).

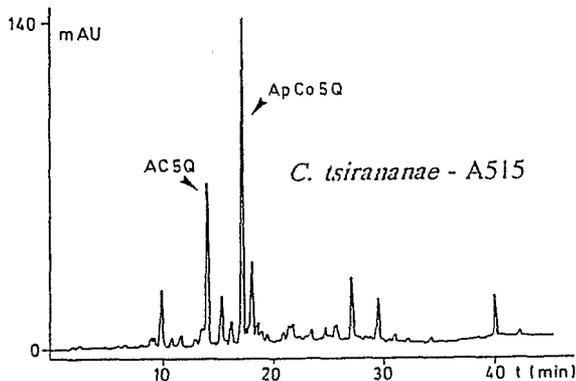


Fig. 4 - Profil chromatographique de l'extrait phénolique brut de *C. tsirananae* (voir texte).

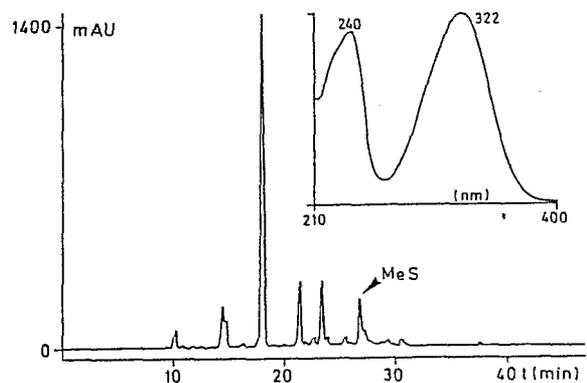


Fig. 5 - Caractérisation du sinapate de méthyle dans l'hydrolysate de *C. andrambovatensis*.

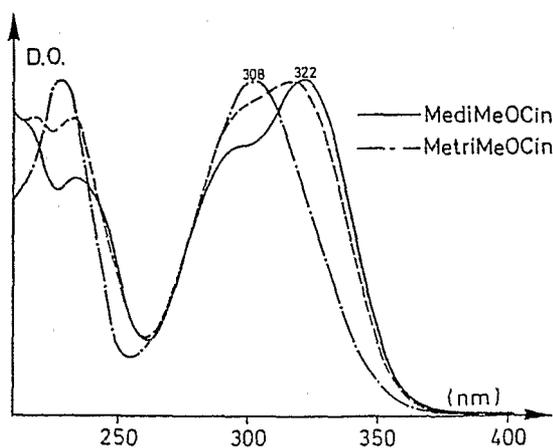


Fig. 6 - Spectres d'absorption des esters méthyliques des acides di et triméthoxy cinnamiques et de leur mélange.

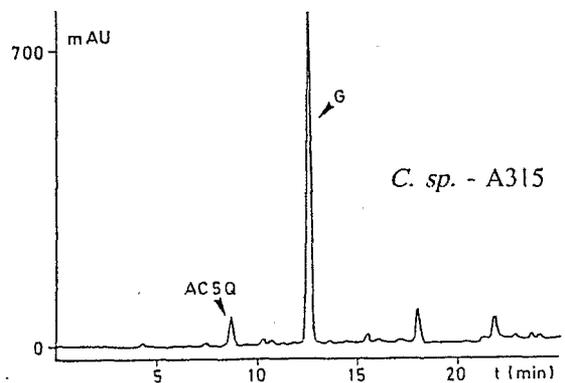


Fig. 7 - Profil chromatographique de l'extrait phénolique brut de *C. sp.* A315.

3 échantillons [m/z : 161 (100), 192 (98), 133 (54), 118 (17), 89 (17), 77 (14)]. Le spectre UV de ce composé est identique à celui du p-coumarate de méthyle.

Nous avons vérifié à partir de témoins d'acides libres et d'acide chlorogénique que les conditions d'hydrolyse et d'analyse ne conduisent pas à des réactions de méthylation. Ainsi, sous réserve de confirmation ultérieure, des dérivés p-méthoxycinnamiques sont considérés comme présents dans les extraits de ces caféiers.

Acide 3,4-diméthoxycinnamique

Présents dans une dizaine de populations, l'ester méthylique de cet acide est par exemple trouvé en grande quantité dans l'hydrolysât (H⁺/MeOH, TMAH) de *C. augagneuri* A519. Sa structure a été confirmée par couplage GC-MS et LC-MS [m/z : 222 (100), 191 (88), 91 (47), 147 (44), 105 (37), 207 (23)].

Acide 3,4,5-triméthoxycinnamique

La caractérisation après hydrolyse de l'ester méthylique de l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique est délicate. En effet, bien que trouvé dans 16 populations, il n'est présent en quantité importante que dans *C. perrieri* ou il est toujours associé avec l'ester de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique dont il est difficile de le séparer par chromatographie. Cependant son spectre de masse [m/z : 252 (100), 237 (56), 221 (52), 177 (21), 209 (14), 149 (13)] le rend facilement distinguable du dérivé diméthoxylé.

Dans nos conditions, l'analyse par couplage LC-MS conduit à un spectre résultant de la somme des spectres des dérivés di et triméthoxylés. La sélection d'ions spécifiques permet cependant de caractériser individuellement chacun des dérivés. De même, le spectre UV du mélange des deux esters (fig 6) correspond à la somme des spectres UV des deux composés témoins.

Acide o-coumarique

Trouvé en abondance dans la série *Multiflorae*, la caractérisation du β - glucoside de l'acide trans o-coumarique ou mélilotoside (composé G) a été effectuée comme suit sur l'échantillon A315 (*C. sp.*) pour lequel le composé G est largement prédominant (fig. 7).

- 1) L'hydrolyse de G (purifié par CLHP préparative) par la β - glucosidase conduit à la formation de glucose et de l'acide trans o-coumarique. L'hydrolyse par l' α - glucosidase est inopérante.
- 2) L'hydrolyse alcaline (OH⁻ et TMAH) n'affecte pas le composé G, il ne s'agit donc pas d'un ester glucosidique. Par ailleurs, le spectre UV montre un léger déplacement bathochrome (+ 8 nm) indiquant que le groupement carboxyle est libre.
- 3) L'hydrolyse acide en milieu aqueux fait apparaître après 15 min l'acide trans o-coumarique (56%) et la coumarine (44%). Après 3 heures de réaction, l'acide libre disparaît totalement au profit de la coumarine, laquelle est accompagnée des produits de dégradation thermique du glucose (5-hydroxyméthyl furfural et furfurole).
- 4) L'hydrolyse acide en milieu méthanolique conduit après 1h 30 min à la formation du trans o-coumarate de méthyle (51%) et de la coumarine (49%).
- 5) Toute tentative d'analyse par spectrométrie de masse en couplage (GC ou LC) ou en introduction directe en mode EI (et même CI⁺ ou CI/méthane) conduit à l'obtention du spectre de la coumarine. En fait, les hydrolyses chimiques et la spectrométrie de masse impliquent un traitement thermique entraînant la rupture de la liaison O-glucose et la cyclisation spontanée de l'acide cis o-coumarique (via l'isomérisation trans - cis de l'acide o-coumarique).
- 6) Le profil chromatographique des extraits de *Melilotus alba* et *Melilotus officinalis* indique la présence de 2 composés majeurs correspondant respectivement au mélilotoside et à la coumarine. La co-chromatographie avec l'extrait phénolique de A315 montre que le composé G se confond avec le mélilotoside et possède les mêmes caractéristiques UV.

La présence de ce glucoside dans les caféiers est remarquable. Chez les légumineuses, la destruction de la cellule met en contact l'isomère cis (formé par photoisomérisation) du méllilotoside avec l'enzyme spécifique cis β - glucosidase pour produire l'acide cis o-coumarique qui cyclise spontanément pour donner la coumarine (Oba et al. 1981, Alibert et al. 1982, Rataboul et al. 1985). Chez les caféiers, malgré la destruction inévitable des structures cellulaires lors du broyage, nous n'avons jamais détecté dans les extraits phénoliques bruts ni l'acide o-coumarique ni la coumarine sous forme libre. Ce phénomène pourrait s'interpréter par l'absence de la cis β - glucosidase ou par sa présence sous forme inactivée (Brown 1981).

CONCLUSION

Si le complexe phénolique des caféiers cultivés est très homogène, la diversité des dérivés hydroxycinnamiques de l'ensemble des formes spontanées analysées est tout à fait remarquable. En effet si la présence de dérivés de l'acide p-coumarique apparaît comme naturelle, ces dérivés étant considérés comme les plus fréquents chez les végétaux (Bate-Smith 1956), celle des dérivés de l'acide sinapique est beaucoup plus rare bien que leurs teneurs puissent être élevées (Macheix et al. 1990) et celle des dérivés méthoxycinnamiques est rarissime (Forest & Ray 1972).

BIBLIOGRAPHIE

- ALIBERT G., BOUDET A.M., RATABOUL P. 1982. Transport of o-coumaric acid glucoside in isolated vacuoles of sweet clover (*Melilotus alba*). Developments in Plant Biology, 7, 193-200.
- ANTHONY F., CLIFFORD M.N., NOIROT M. 1989. La diversité biochimique dans le genre *Coffea* et *Psilanthus*. ASIC 13^e colloque, Paipa (Colombie), 474-484.
- BATE-SMITH E.C. 1956. The commoner phenolic constituents of plants and their systematic distribution. Sci. Proc. R. Dublin Soc., 27, 6, 165-176.
- BOURSIQUOT J.M., SAPIS J.C., MACHEIX J-J. 1986. Les esters hydroxycinnamiques chez le genre *Vitis*. Essai d'application taxonomique. C. R. Acad. Sci. Serie III, 302, 177-180.
- BROWN S.A. 1981. Coumarins. In : The Biochemistry of Plants, vol 7, Conn E.E. edit., Academic Press (New York), pp 269-300.
- CHASSEVENT F., ORNANO M.d', POUGNEAUD S. 1967. Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. IV - Isolement et étude la structure de la cafamarine, substance amère de *C. buxifolia*. Café Cacao Thé, 11, 343-349.
- CHASSEVENT F., DALGER G., GERWIG S., VINCENT J-C. 1974. Contribution à l'étude des *Mascarocoffea* : Etude des fractions lipidiques et insaponifiables. Relation éventuelle entre les teneurs en caféine et en acides chlorogéniques. Café, Cacao, Thé, 18, 49-56.
- CHEVALIER A. 1938. Essai d'un groupement systématique des caféiers sauvages de Madagascar et des Iles Mascareignes. Rev. Bot. Appl. et Agr. Trop., 825-843.
- CLIFFORD M.N. 1985. Chlorogenic acids. In : Coffee Vol I, Clark R.J. & Macrae R. edit., Elsevier (Londres), pp 155-202.
- CLIFFORD M.N., WILLIAMS T., BRIDSON D. 1989a. Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*. Phytochem., 28, 829-838.
- CLIFFORD M.N., KELLARD B., BIRCH G.G. 1989b. Characterisation of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxyde. Food Chem., 33, 115-123.
- CLIFFORD M.N., GIBSON C.L., RAKOTOMALALA J-J. R., CROS E., CHARRIER A. 1991. Caffeine from green beans of *Mascarocoffea*. Phytochem., 30, 4039-4040.
- COLONNA J.P. 1979. L'acide chlorogénique et les depsides de divers caféiers africains et malgaches : leur participation au métabolisme et leur signification biologique. Travaux et Documents de l'ORSTOM, n°102, 210 p.
- FLEURIET A. & MACHEIX J-J. 1972. Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. J. Chromatog., 74, 339-345.
- FOREST T.P. & RAY S. 1972. 3,4-dimethoxy-trans-cinnamique acid from *Nuphar variegatum*. Phytochem., 11, 855.
- HARBORNE J.B. 1984. Chemical data in practical taxonomy. In : Current Concepts in Plant Taxonomy, Heywood V.H. et Moore D.M. edit., Academic Press (Londres).
- LEROY J.F. 1967. Recherches sur les caféiers. Sur la classification biologique des caféiers et sur l'origine et du genre *Coffea*. C. R. Acad. Sci., 265, 1043-1045.

- MACHEIX J.-J., FLEURIET A., BILLOT J. 1990. Fruits phenolics. C. R. Press (Boca Raton-Floride), 378p.
- MORISHITA H., IWAHASHI H., KIDO R. 1986. 4-O-feruloylquinic acid from green coffee beans. Phytochem., 25, 1496-1497.
- MORISHITA H., TAKAI Y., YAMADA H., FUKUDA F., SAWADA M., IWAHASHI H., KIDO R. 1987. Caffeilytryptophane from green robusta coffee beans. Phytochem., 26, 1195-1196.
- OBA K., CONN E.E., CANUT H., BOUDET A.M. 1981. Subcellular localization of 2- β -D-glucosyloxycinnamic acids and related β -glucosidase in leaves of *Melilotus alba* cultivar spanish. Plant Physiol., 68, 1359-1363.
- ORNANO M. d', CHASSEVENT F., POUGNEAUD S. 1967. Composition et caractéristiques chimiques des Coffea sauvages de Madagascar. II - Recherche de la caféine et d'autres méthylxanthines dans les feuilles et les graines de caféiers sauvages et cultivés. III - Cafamarine et trigonelline contenues dans les graines de trois caféiers sauvages. ASIC 3è Colloque, Trieste (Italie), 101-114.
- POISSON J. 1977. Aspects chimiques et biologiques de la composition du café vert. ASIC 8è Colloque, Abidjan (Côte d'Ivoire), 35-57.
- RAKOTOMALALA J.-J. R. 1992. Diversité biochimique des caféiers : Analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosidiques. Particularité des caféiers sauvages de la région malgache (Mascarocoffea Chev.). Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II.
- RAKOTOMALALA J.-J. R., CROS E., CLIFFORD M.N., CHARRIER A. 1992. Caffeine and theobromine in green beans from *Mascarocoffea*. Phytochem., 31, 1271-1272.
- RATABOUL P., ALIBERT G., BOLLER T., BOUDET A.M. 1985. Intracellular transport and vacuolar accumulation of o-coumaric acid glucoside in *Melilotus alba* mesophyll cell protoplasts. Biochem. Biophys. Acta, 816, 25-36.
- TRUGO L.C., MACRAE R. 1984. Chlorogenic acid composition of instant coffees. Analyst, 109, 263-266.
- VAN DER STEGEN G.H.D. & VAN DJUIN J. 1980. Analysis of chlorogenic acids in coffee. ASIC 9è Colloque, Londres (UK), 107-112.

Résumé

QUELQUES ACIDES PHENOLS PARTICULIERS DES FEVES DE CAFEIERS SAUVAGES MALGACHES ET AFRICAINS.

L'analyse systématique des dérivés hydroxycinnamiques a été effectuée sur les graines de fruits matures de 56 populations de caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea*) et de 14 échantillons représentant 9 espèces africaines (*Eucoffea*).

Le profil chromatographique (CLHP) de la fraction phénolique totale est généralement complexe et les acides phénols sont dans la majorité des cas caractérisés sous forme d'esters méthyliques (obtenus par hydrolyse : H⁺/MeOH, TMAH) par comparaison de leurs temps de rétention, spectres UV et spectres de masse (GC-MS, LC-MS) avec des témoins commerciaux.

Les acides férulique et p-coumarique sont largement représentés dans les échantillons, l'acide caféique l'étant dans tous. Chez *Mascarocoffea*, les acides sinapique et 4-méthoxycinnamique sont en faibles concentrations relatives dans plusieurs peuplements alors que les acides o-coumarique, 3,4-diméthoxycinnamique et 3,4,5-triméthoxycinnamique sont, quand ils sont présents, les composés phénoliques majeurs du mélange.

Les acides phénols sont de bons marqueurs de la diversité biochimique des caféiers.

Summary

PECULIAR PHENOLIC ACIDS FROM WILD MADAGASCAN AND AFRICAN COFFEES.

An extensive study of hydroxycinnamic derivatives was carried out on beans of mature fruits from 56 populations of wild Madagascan coffee (*Mascarocoffea*) and from 14 samples representing 9 African coffee species (*Eucoffea*).

The HPLC profiles of the raw phenolic extracts were generally complicated, so phenolic acids were in most cases transformed into their methyl esters (obtained after hydrolysis : H⁺/MeOH, TMAH). These esters were characterized by comparison of their retention times, UV and mass spectra (GC-MS, LC-MS) with those of authentic commercial samples. Ferulic and p-coumaric acids were found in most samples and caffeic acid in all samples. In *Mascarocoffea*, sinapic and 4-methoxycinnamic acids were at low relative concentrations in some populations, whereas o-coumaric, 3,4-dimethoxycinnamic and 3,4,5-trimethoxycinnamic acids were, when present, the main phenolics.

Phenolics are good markers of the biochemical diversity within coffee germplasm.

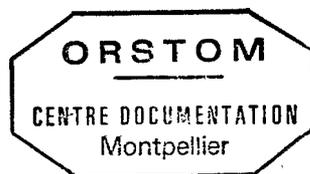
ISBN 2-900212-14-6

QUINZIÈME COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ

Montpellier, 6-11 juin 1993

Volume I

20 JAN. 1994



Association Scientifique Internationale du Café
(ASIC)
42, rue Scheffer, 75116 Paris