

CHROM. 17,037

**Note**

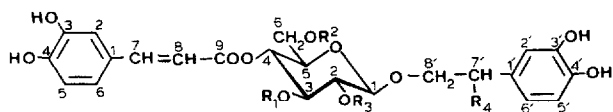
**Microméthode d'analyse des esters hétérosidiques de l'acide caféique**

C. ANDARY\*, J. L. ROUSSEL, J. P. RASCOL et G. PRIVAT

*Laboratoire de Botanique et Cryptogamie, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier Cedex (France)*

(Reçu le 9 juillet 1984)

Les esters hétérosidiques de l'acide caféique (E.H.C.) sont des molécules complexes qui ont été décelées et identifiées chez de nombreuses espèces appartenant essentiellement à l'ordre des Tubiflorales (ex: Orobanchacées, Scrophulariacées, Labiées, Verbénacées, Acanthacées)<sup>1-7</sup>. Dans ces molécules, l'acide caféique, estérifie un hétéroside (au niveau d'un glucose central) dont l'aglycone est le dihydroxyphényl éthanol (Fig. 1). Cet alcool est cependant remplacé par le dihydroxyphényl glycol dans l'orobanchoside qui semble être caractéristique des Orobanchacées.



E.H.C.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Réf.
Verbascoside (V.)	Rha	H	H	H	1
Poliumoside (P.)	Rha	Rha	H	H	3
Pheliposide (Ph.)	Rha	Xyl	H	H	4
Arenarioside (A.)	Rha	Xyl	CH <sub>3</sub> -CO	H	4
Myricoside (M.)	Rha-Api	H	H	H	5
Echinacoside (E.)	Rha	Glc	H	H	6
Orobanchoside (O.)	H	H	Rha	OH	1

Fig. 1. Formules chimiques des différents E.H.C. analysés. Abréviations: Api = apiose; Glc = glucose; Rha = rhamnose; Xyl = xylose.

Ces E.H.C. pharmacologiquement actifs<sup>5,8</sup> et difficiles à séparer, ne se différencient que par la nature de leurs sucres et par la position des liaisons osidiques. Devant le nombre croissant de nouveaux E.H.C. identifiés ou en cours d'identification, nous avons mis au point une méthode d'analyse rapide et pratique, ne nécessitant que de très faibles quantités de produit.

Cette méthode comporte deux phases distinctes. La première consiste en une hydrolyse acide totale de l'E.H.C. qui nous renseigne sur la nature et le nombre de sucres contenus dans la molécule. La deuxième phase consiste à réaliser la fragmentation de l'E.H.C. directement sur chromatoplaque par hydrolyse acide ménagée. Cette hydrolyse ménagée de l'E.H.C., suivie dans le temps, est effectuée en parallèle

avec celle du verbascoside. En effet, cette dernière molécule est la molécule la plus simple à partir de laquelle la structure des autres E.H.C. s'élabore. En comparant les fragments obtenus à la suite de l'hydrolyse ménagée des E.H.C. on peut ainsi en déduire une série de renseignements caractéristiques et utiles à la détermination de ces molécules.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

##### *Microhydrolyse de la fraction osidique des E.H.C.*

*Matériels et réactifs.* Acide chlorhydrique 3 N; chromatoplaque de gel de silice à haute performance (HPTLC, Merck, réf. 5633); acétate d'éthyle (Merck, pour analyse); solvant: butanol-acétone-tampon phosphate (pH = 5) (40:50:10)<sup>9</sup>; révélateur: (a) chlorure de triphényltétrazolium (Merck) à 4% dans le méthanol, (b) hydroxyde de sodium 1 N.

*Mode opératoire.* L'hydrolyse des E.H.C. est réalisée en mélangeant 100  $\mu$ l d'une solution méthanolique à 0.1-0.5% d'E.H.C. et 100  $\mu$ l d'acide chlorhydrique 3 N. Ce mélange est chauffé à 100°C pendant 3 h. Après refroidissement, la solution est traitée par 0.5 ml d'acétate d'éthyle qui est ensuite rejeté. Des solutions équimolaires de sucres étalons sont traitées de la même manière. Les solutions d'E.H.C. hydrolysées sont directement chromatographiées à côté des solutions étalons de sucres dans le système indiqué. Le réactif (a) mélangé à volume égal au réactif (b) révèle les sucres en rouge-brique après chauffage des chromatogrammes à 100°C pendant 5 min.

##### *Technique de fragmentation des E.H.C. par hydrolyse acide sur chromatoplaque*

*Matériels et réactifs.* Acide chlorhydrique 3 N; chromatoplaque de gel de silice à haute performance (HPTLC, Merck, réf. 5633); solvant: acétate d'éthyle-acide formique-eau (100:20:30); révélateur: solution de diphénylborate amino-2-éthyle (Fluka) à 1% dans le méthanol (ou réactif de Neu); solutions d'E.H.C. à 0.5% dans le méthanol.

*Mode opératoire.* Chaque dépôt d'E.H.C. (2 à 3  $\mu$ l), après avoir été séché dans un courant d'air froid, est recouvert de 2  $\mu$ l d'acide chlorhydrique. Sans sécher cette fois-ci, on pose une plaque de verre propre par dessus le dépôt acidifié et délicatement on met le tout à chauffer à 100°C pendant un temps déterminé. On étudie ainsi l'hydrolyse des E.H.C. au bout de 5, 10, 15 et 30 min en réalisant une nouvelle chromatoplaque pour chacune de ces durées. A la fin de chaque chauffage on ajoute sur la chromatoplaque les E.H.C. témoins à côté de chaque E.H.C. hydrolysé et on développe dans le solvant indiqué. Après un séchage suffisant de la chromatoplaque dans un courant d'air chaud, la révélation par le réactif de Neu rend fortement fluorescent l'acide caféique et tout fragment en contenant.

#### RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le cas de l'hydrolyse totale des E.H.C., le choix des conditions chromatographiques et le fait d'éliminer les produits de dégradation par l'acétate d'éthyle, permettent de chromatographier directement l'hydrolysate et d'analyser les sucres. Le même traitement pour les solutions étalons de sucre améliore la comparaison des  $R_f$  et des  $R_G$  (Tableau I).

TABLEAU I

VALEURS DES  $R_F$  ET DES  $R_G$  DES SUCRES ÉTALONS APRÈS TRAITEMENT ACIDE

Sucres	$R_F$	$R_G$
Galactose	0.27	0.84
Glucose	0.32	1.00
Xylose	0.50	1.56
Apiose	0.56	1.75
Rhamnose	0.63	1.96

Enfin, une évaluation semi-quantitative est très simple à réaliser grâce à la bonne coloration des taches et à la comparaison entre l'intensité de la coloration des sucres témoins en solution équimolaire et celle des sucres appartenant au verbascoside.

Par ailleurs, l'hydrolyse ménagée des différents E.H.C. réalisée sur chromatoplaque en comparaison avec celle du verbascoside nous fait apparaître des fragments identiques ou différents qui vont nous renseigner sur la labilité des sucres, leur emplacement et la nature des autres molécules composant l'ester hétérosidique.

Pour mieux démontrer cette fragmentation nous avons rassemblé dans les Fig. 2 et 3, le résultat de l'hydrolyse ménagée du verbascoside (V.) et de l'échinacoside (E.) aux temps 5, 10, 15 et 30 min.

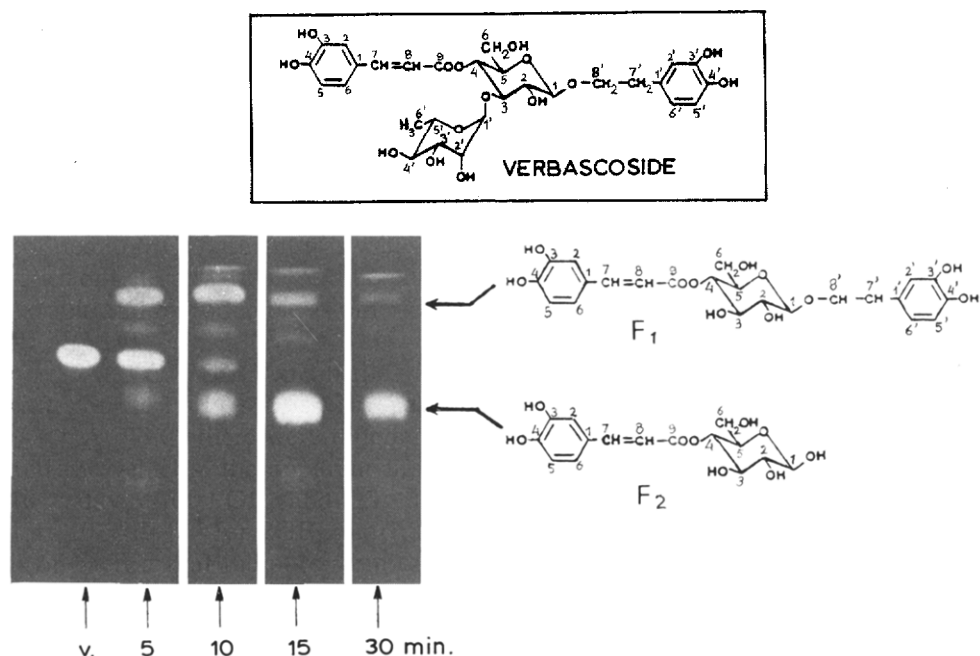


Fig. 2. Cinétique de l'hydrolyse ménagée du verbascoside réalisée directement sur chromatoplaque de gel de silice (HPTLC). Hydrolyse au bout des temps 5, 10, 15 et 30 min. Solvant de développement: acétate d'éthyle-acide formique-eau (100:20:30); révélateur: diphenylborate amino-2-éthyle.

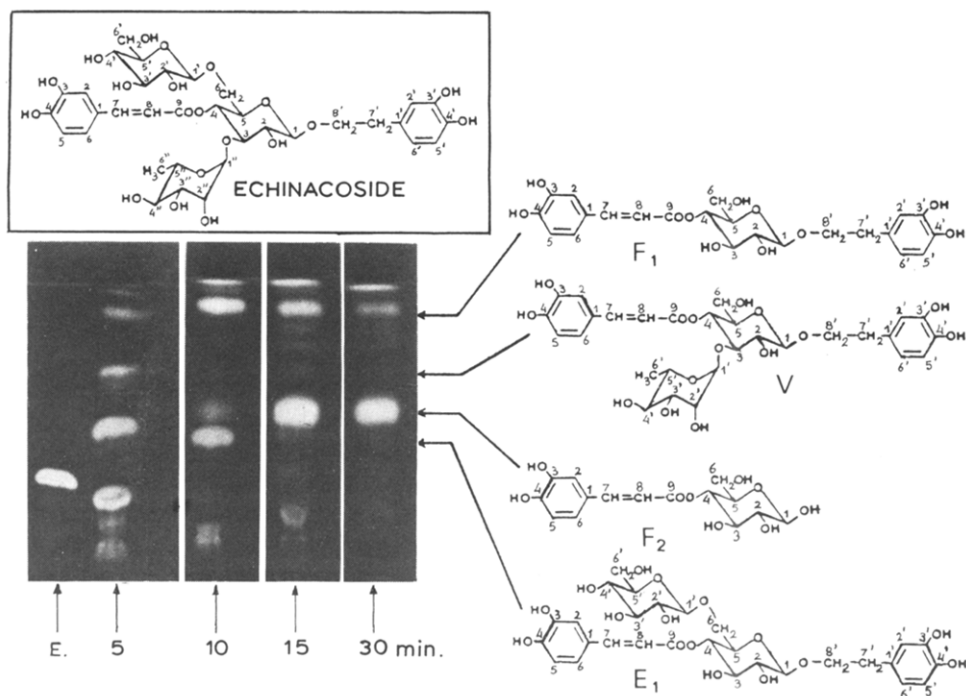


Fig. 3. Cinétique de l'hydrolyse ménagée de l'echinacoside réalisée directement sur chromatoplaque de gel de silice (HPTLC). Hydrolyse au bout des temps 5, 10, 15 et 30 min. Mêmes conditions chromatographiques que pour la Fig. 2.

Les fragments les plus importants et qui apparaissent progressivement au cours de l'hydrolyse sont: F<sub>1</sub> ou caféoyl-4-glucose lié au dihydroxyphényléthanol (ou au dihydroxyphényl glycol (F<sub>1</sub>') pour l'orobanchoside) puis F<sub>2</sub> ou caféoyl-4-glucose. Ces fragments ont été analysés à la suite de leur isolement par chromatographie préparative sur couche mince de silice<sup>1</sup>.

A titre d'application pratique nous présentons à l'aide d'une chromatographie comparative (Fig. 4), l'hydrolyse ménagée au bout de 5 min. de sept E.H.C. Ce temps d'hydrolyse permet de retrouver une partie de la molécule initiale, non encore hydrolysée et d'observer le plus grand nombre de fragments majoritaires. Les molécules telles que le poliumoside, le pheliposide, l'arenarioside, le myricoside et l'échinacoside, en libérant du verbascoside prouvent l'existence dans leur molécule d'un sucre supplémentaire plus labile que le rhamnose fixé en C-3 du glucose central. Pour le poliumoside, par exemple, le degré de liberté du rhamnose en C-6 est vérifié au cours de l'étude du spectre RMN du <sup>13</sup>C de la molécule<sup>3</sup> où l'on observe, pour les déplacements chimiques des carbones de ce rhamnose, des intensités nettement supérieures à celles des carbones du rhamnose lié en C-3. Notons que pour l'échinacoside ce même rhamnose est par contre plus labile que le glucose supplémentaire lié au C-6 du glucose central (Fig. 3 et 4). Enfin, l'étude des fragments relatifs aux molécules d'arenarioside et de pheliposide est également instructive. L'arenarioside se divise en deux fragments d'égale importance (V. et A<sub>1</sub>) indiquant que le rhamnose et le sucre supplémentaire, ici du xylose, ont la même facilité de séparation. Le pheliposide par

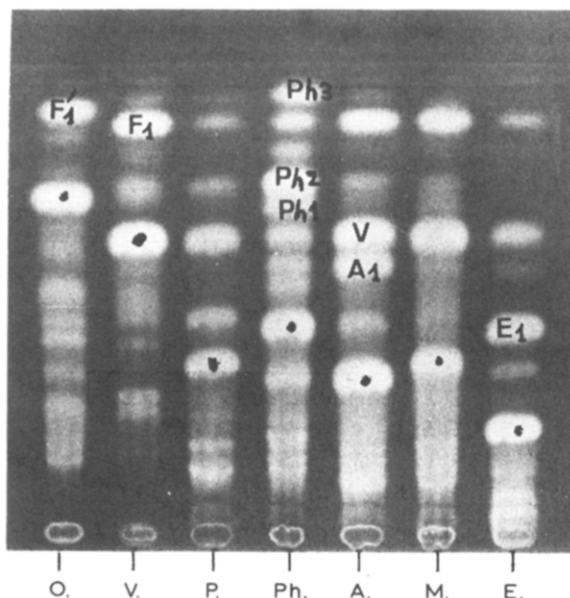


Fig. 4. Comparaison de l'hydrolyse ménagée des différents E.H.C. sur chromatoplaque de gel de silice (HPTLC) au bout de 5 min. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que pour les Fig. 2 et 3. Le point noir sur certaines taches indique l'E.H.C. initial encore présent en forte concentration. Abréviations: O. = orobanchoside; V. = verbascoside; P. = poliumoside; Ph. = pheliposide; A. = arenarioside; M. = myricoside; E. = echinacoside.

contre semble plus complexe. Tout en libérant les mêmes fragments que pour l'arenarioside, mais en faible proportion, il se fragmente en de nouvelles molécules ( $Ph_1$ ,  $Ph_2$  et  $Ph_3$ ) qui rappellent celles données par l'arenarioside avec cependant un  $R_f$  plus élevé. Ceci s'explique par la présence du groupement  $CH_3-COO$  (fixé au niveau du C-2 du glucose central) qui entraîne l'apparition de fragments homologues mais moins polaires que ceux libérés par l'arenarioside. Tous ces E.H.C. relâchant du verbascoside font apparaître, de ce fait, les fragments  $F_1$ , puis  $F_2$  caractéristiques de cette dernière molécule.

En conclusion, nous pouvons dire que cette microméthode d'analyse a l'avantage de nous donner très rapidement des renseignements sur la nature des sucres et de la molécule elle-même en attendant une confirmation et une structure totale par spectrométrie RMN. De plus, ces résultats peuvent être obtenus à partir de petites quantités de substances de l'ordre de 200 à 300  $\mu g$ . Cette méthode nous permettra d'entreprendre plus aisément des travaux sur le métabolisme et la biosynthèse de ces E.H.C. Enfin, ce processus de fragmentation par hydrolyse directe sur chromatoplaque peut être appliqué à l'étude d'autres hétérosides tels que les saponosides.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. Andary, R. Wylde, C. Laffite, G. Privat et F. Winternitz, *Phytochemistry*, 21 (1982) 1123.
- 2 J. L. Roussel, *Thèse, Doct. ès Sci. Pharm.*, Montpellier, France, 1983.
- 3 C. Andary, R. Wylde, A. Heitz, J. P. Rascol et J. L. Roussel, *Phytochemistry*, (1984), sous presse.

- 4 C. Andary, R. Wylde, A. Heitz et G. Privat, *Planta Med.*, (1984), soumis pour publication.
- 5 R. Copper, P. H. Solomon, I. Kubo, K. Nakanishi, J. N. Shoolery et J. L. Occolowitz, *J. Amer. Chem. Soc.*, 102 (1980) 7953.
- 6 H. Becker, W. C. Hsieh, R. Wylde, C. Laffite et C. Andary, *Z. Naturforsch.*, 37 C (1982) 351.
- 7 C. Andary, J. Pellecuer, I. Soediro et G. Privat, *Pharm. Mediter.*, 12 (1978) 237.
- 8 C. Andary, G. Privat, P. Chevallet, H. Orzalesi, J. J. Serrano et M. Boucard, *Il Farmaco*, 35 (1980) 3.
- 9 D. Waldi, *J. Chromatogr.*, 18 (1965) 417.