

CHROM. 17,512

Note

Isolement, identification et dosage de l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique par chromatographie liquide haute-performance des composés phénoliques de *Loiseleuria procumbens* Desf. (Ericaceae)

LÉON SERVE* et GEORGES COMBAUT

Laboratoire de Biologie Végétale, Université de Perpignan, Avenue de Villeneuve, F-66025 Perpignan Cedex (France)

et

LOUIS PIOVETTI

Département de Chimie, Université de Toulon et du Var, Château Saint-Michel, F-83130 La Garde (France)
(Reçu le 27 décembre 1984)

Nous avons récemment étudié^{1,2} les composés phénoliques de trois végétaux de haute-montagne, une Ericacée, *Loiseleuria procumbens*, une Papilionacée, *Trifolium alpinum* et une Graminée, *Festuca supina*. Tous les composés phénoliques des deux dernières espèces ont été identifiés et dosés par chromatographie liquide haute-performance (CLHP). Par contre une inconnue subsistait en ce qui concerne le pic le plus intense du chromatogramme de l'extrait phénolique de *Loiseleuria procumbens*. Ce composé n'étant pas identifié, son dosage n'a pu être réalisé, les analyses précédemment effectuées restaient donc incomplètes. Nous décrivons ici l'isolement de ce composé par CLHP semi-préparative, son identification et son dosage, après étalonnage, dans les différents extraits phénoliques précédemment analysés de *Loiseleuria procumbens*: dans la fraction acides fulviques (AF) du végétal et du sol qu'il recouvre avec un haut coefficient d'abondance-dominance¹; dans les hydrolysats acidosolubles des fractions acides humiques (AH) du sol et AH néoformés du végétal².

PARTIE EXPERIMENTALE

Appareil

Ce travail est effectué sur un chromatographe Waters Assoc. précédemment décrit^{1,2}. Pour la séparation et la purification du composé de structure inconnue, on utilise une colonne en acier inoxydable, 250 × 10 mm, remplie de LiChrosorb RP-18 de granulométrie moyenne 7 µm (E. Merck, Darmstadt, Allemagne Fédérale). Le solvant d'éluion est le mélange eau-acétonitrile-acide acétique (88:10:2) avec un débit de 6 ml/min.

Isolement

Le chromatogramme analytique d'un extrait phénolique des AF de *Loiseleuria procumbens* est représenté sur la Fig. 1, celui du composé purifié sur la Fig. 2. L'extrait

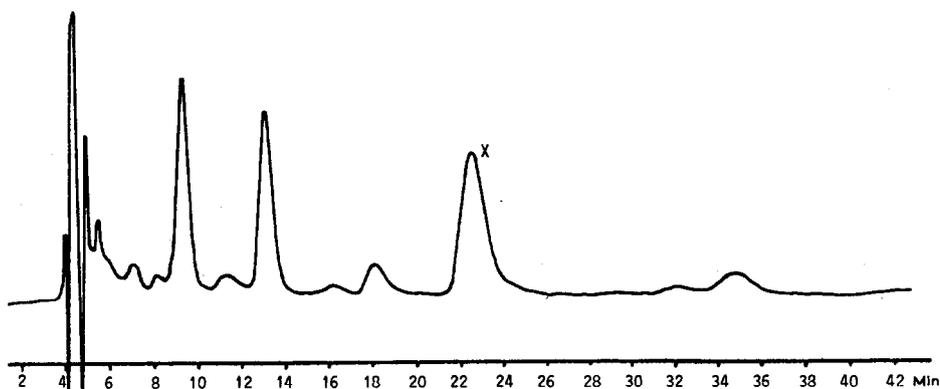


Fig. 1. Chromatogramme de l'ensemble phénolique extrait de *Loiseleuria procumbens*.

phénolique des AF de *Loiseleuria procumbens* (10 g), en solution dans le méthanol, est injecté par fractions de 100 μ l. On obtient environ 50 mg de produit pur identifié à l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique par spectrométrie de masse (SM) et résonance magnétique nucléaire (RMN).

Étalonnage de l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique

Les mélanges de référence sont effectués à partir d'une solution méthanolique d'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique commercial (Sigma) à 600 mg/l. L'étalonnage se fait par rapport à l'acide *p*-anisique utilisé comme étalon interne (solution dans le méthanol à 510 mg/l). A 5 ml de cette solution sont ajoutés successivement 3,5; 5,5; 7,3 et 11 ml de la solution d'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique con-

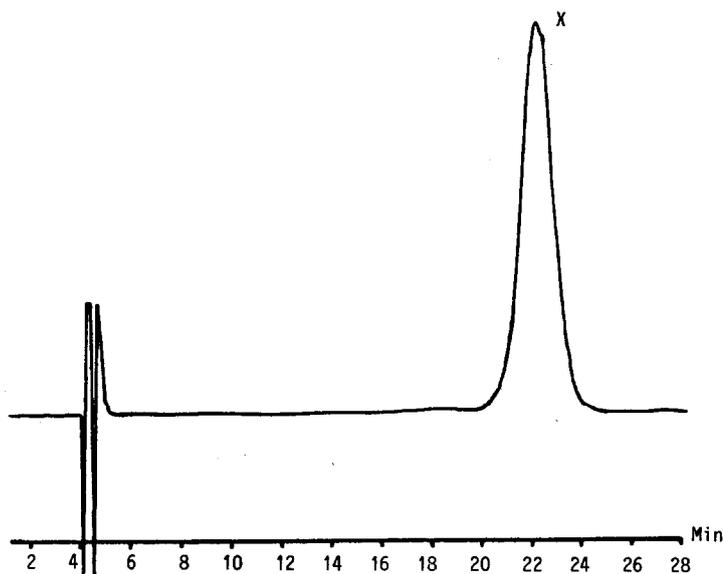


Fig. 2. Chromatogramme des 45 mg de produit (PF 127°C) obtenus par CLHP semi-préparative sur l'ensemble phénolique extrait de 10 g de *Loiseleuria procumbens*.

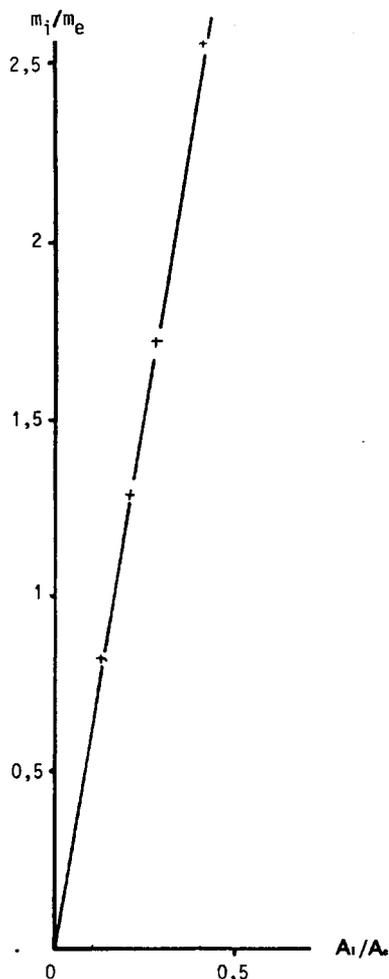


Fig. 3. Courbe d'étalonnage de l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique commercial (i) par référence à l'acide *p*-anisique (e). r = coefficient de corrélation significatif entre 95% et 99,9% = 0,999; σ_m = erreur-type d'estimation = 0,005.

duisant à des rapports m_i/m_e de 0,82; 1,30; 1,72 et 2,60 respectivement. Les rapports des aires correspondantes sont A_i/A_e : 0,13; 0,21; 0,28 et 0,42. La courbe d'étalonnage $m_i/m_e = f(A_i/A_e)$ est une droite d'équation $y = 6,14x + 0,01$ (Fig. 3).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le composé phénolique X est obtenu pur (Fig. 2) à partir de l'ensemble phénolique extrait de 10 g de *Loiseleuria procumbens* par 1000 ml d'hydroxyde de sodium 1 N. L'extrait brut des AF¹ est chromatographié sur colonne Si-gel en solution dans l'acétate d'éthyle. La fraction phénolique ainsi isolée est injectée en solution dans le méthanol sur une colonne semi-préparative (250 × 10 mm) de LiChrosorb RP-18 (granulométrie moyenne 7 μ m).

Le mélange eau-acétonitrile-acide acétique (88:10:2) est utilisé comme éluant. On obtient 45 mg de X (Fig. 2); ce produit X (PF 127°C) est identifié par spectro-

TABLEAU I
COMPOSITION DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES

A = AF de *Loiseleuria procumbens*; B = AF d'un sol à *Loiseleuria procumbens*; C = hydrolysats de AH d'un sol à *Loiseleuria procumbens*; D = AH néoformés de *Loiseleuria procumbens*.

Composé phénolique	Quantité (mg/g)			
	A*	B**	C**	D*
Acide protocatéchiq	0,922		0,075	0,220
Acide <i>p</i> -hydroxy-benzoïque	3,516	0,406	1,158	0,830
Acide syringique	0,058	0,017	0,153	traces
Acide vanillique				
<i>p</i> -Hydroxybenzaldéhyde	0,014	0,006	0,012	traces
Acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique	5,520	0,060	0,165	0,120
Vanilline	—	0,007	0,020	traces
Acide <i>trans</i> -coumarique	0,528	0,031	—	—
Acide <i>cis</i> -coumarique				
Acide <i>trans</i> -fêrulique	0,484	0,041	—	—
Acide <i>cis</i> -fêrulique				
Acide benzoïque	1,010	0,119	—	—

* mg/g de végétal sec.

** mg/g de sol sec.

métrie de masse (M^+ 166, pic de base m/z 107, $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2^+$) à l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique. La structure est confirmée par spectrométrie de RMN du H^+ et par co-injection en CLHP avec un échantillon authentique (Sigma). La courbe d'étalonnage (Fig. 3) est réalisée à l'aide de l'acide commercial par référence avec l'acide *p*-anisique. La droite d'étalonnage est comparable à celle obtenue pour l'acide *p*-hydroxybenzoïque¹. Elle permet d'évaluer les taux en acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique dans les extraits phénoliques¹ obtenus à partir du *Loiseleuria procumbens* et d'un sol sur lequel ce végétal est dominant (Tableau I). De même la composition en acides phénoliques obtenus à partir des hydrolysats des acides humiques d'un sol à *Loiseleuria procumbens* dominant et en acides humiques néoformés est complétée (Tableau I) par l'évaluation de l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique dans des échantillons précédemment incomplètement analysés².

On peut observer que l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique représente près de la moitié de l'ensemble phénolique dosé dans les AF de *Loiseleuria procumbens*, alors que l'acide *p*-hydroxybenzoïque n'en représente que le tiers environ. Par contre, tant dans les AF et AH du sol que dans les AH néoformés, l'acide *p*-hydroxybenzoïque représente les trois quarts des phénols dosés alors que l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique n'en représente que le dixième. Nous confirmons par ailleurs, par co-injection, que l'acide (hydroxy-4-phényl)-3-propionique n'est pas présent dans les extraits phénoliques des deux autres végétaux précédemment étudiés *Trifolium alpinum* et *Festuca supina*.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 L. Serve, L. Piovetti et N. Longuemard, *J. Chromatogr.*, 259 (1983) 319.
- 2 L. Serve, L. Piovetti et N. Longuemard, *J. Chromatogr.*, 292 (1984) 458.