

Note

Dosage par chromatographie liquide haute-performance des phloridzozide, phlorétol et acide phlorétique de *Loiseleuria procumbens* (L.) Desv. (Ericaceae)

LÉON SERVE*, ALAIN SANCHO 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 12 décembre 1985)

Nous avons précédemment étudié les acides et aldéhydes phénoliques d'une Ericacée de haute-montagne *Loiseleuria procumbens*¹⁻³ selon un procédé qui met en oeuvre une extraction en milieu basique de la plante. Dans ces conditions l'acide (hydroxy-4-phenyl)-3-propionique a été identifié³. On sait par ailleurs que cet acide (acide phlorétique) est un des produits de dégradation en milieu basique du phloridzozide. Ce glucoside, très répandu dans le règne végétal, en particulier chez les Rosacées^{4,5}, a été mis en évidence chez *L. procumbens*. Nous décrivons ici une méthode de dosage du phloridzozide par chromatographie liquide haute-performance (CLHP) et nous répondons à la question de savoir si l'acide phlorétique existe réellement dans la plante ou est un artefact formé lors du traitement du végétal en milieu basique¹⁻³.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareil

Le dispositif utilisé comprend: une pompe Merck LC-655A-11, un injecteur Rhéodyne 7125 équipé d'une boucle d'injection de 20 μ l; un spectrophotomètre Shimadzu SPD-6A réglé à 275 nm avec une cuve de 8 μ l; un enregistreur linéaire Linear.

La séparation est obtenue sur une colonne analytique Hibar (250 \times 4 mm, Merck) contenant la phase stationnaire inversée LiChrosorb RP-18 (granulométrie 5 μ m), équipée d'une pré-colonne (30 \times 4 mm) de mêmes caractéristiques.

Le solvant d'éluion est un mélange eau-acétonitrile-acide acétique (76:22:2) avec un débit de 1 ml/min.

Extractions de *L. procumbens* (plante entière)

Quatre types d'extraction de la plante sèche ont été réalisés:

Traitement 1. 15,9 g de poudre végétale sont extraits au Soxhlet par chloroforme (1 l; 1/2 h) ce qui permet d'éliminer lipides et pigments puis par chloroforme-méthanol (50:50, v/v) (1 l; 12 h). Après évaporation sous vide du binaire

d'extraction, on obtient 4,5 g d'un résidu qui sera injecté en chromatographe liquide en solution méthanolique.

Traitement 2. 0,476 g de poudre végétale est extrait à l'eau à 20°C (50 ml; 1/2 h). Après centrifugation, la solution sera injectée directement en chromatographe liquide.

Traitement 3. 0,467 g de poudre végétale est extrait à l'eau à 100°C (50 ml; 1/2 h). On opère ensuite de la même manière que pour le traitement 2.

Traitement 4. 0,502 g de poudre végétale est extrait par l'hydroxyde de sodium 1 N (50 ml; 12 h; 20°C). Après centrifugation et acidification à pH 1, la solution est extraite par l'acétate d'éthyle. Le résidu après évaporation sous vide de l'acétate d'éthyle est injecté en chromatographie liquide en solution dans le méthanol³.

Étalonnage du phloridzoside (i_1) et du phlorétol (i_2) par l'acide cinnamique (e)

Les trois produits sont commerciaux (Sigma).

On réalise une solution de phloridzoside (4,72 mg) et de phlorétol (2,76 mg) dans 2 ml de méthanol. À 0,1 ml de cette solution sont ajoutés successivement 1, 0,3, 0,1, 0,05 ml d'une solution méthanolique d'acide cinnamique à 0,49 mg/ml. Les trois composés sont parfaitement séparés par CLHP sur colonne RP-18 en utilisant un mélange ternaire eau-acétonitrile-acide acétique. L'échelonnement optimum du

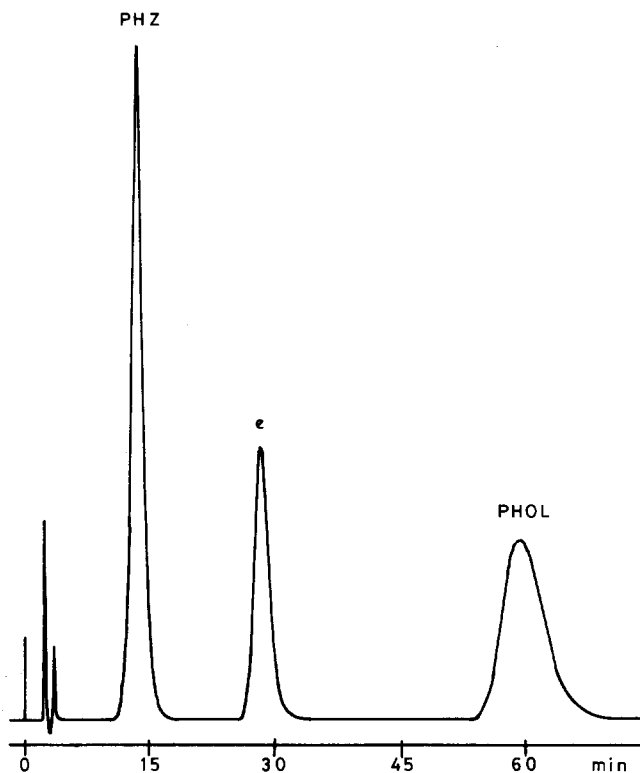


Fig. 1. Chromatogramme du mélange d'échantillons commerciaux de phloridzoside (PHZ), de phlorétol (PHOL) et d'acide cinnamique (e). Phase stationnaire; LiChrosorb RP-18; phase mobile: eau-acétonitrile-acide acétique (76:22:2); débit: 1 ml/min; détection UV à 275 nm.

PHZ

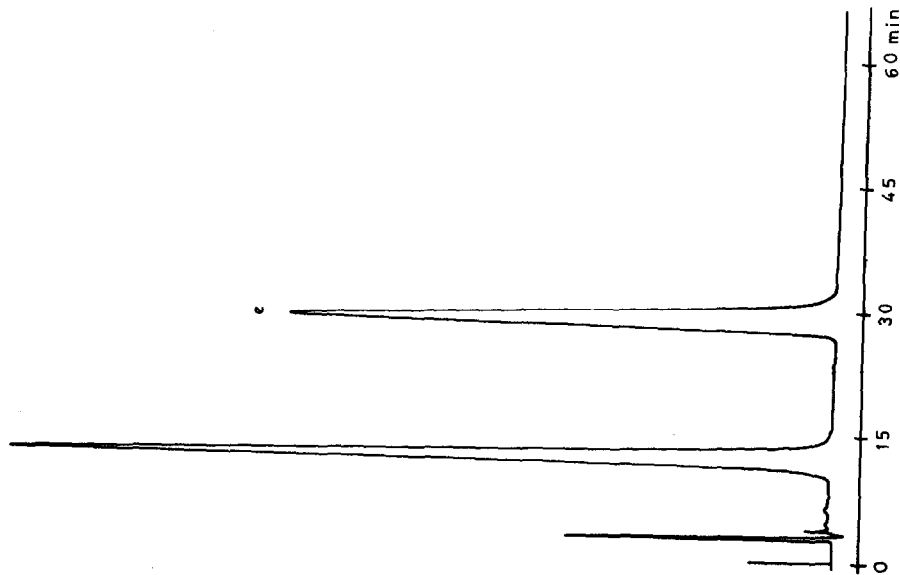


Fig. 2. Chromatogramme d'une solution de phlorizoside (PHZ) commercial traité par l'hydroxyde de sodium 1 N à 20°C. Étalon interne: acide cinnamique (e). Conditions de la chromatographie identiques à celles de la Fig. 1.

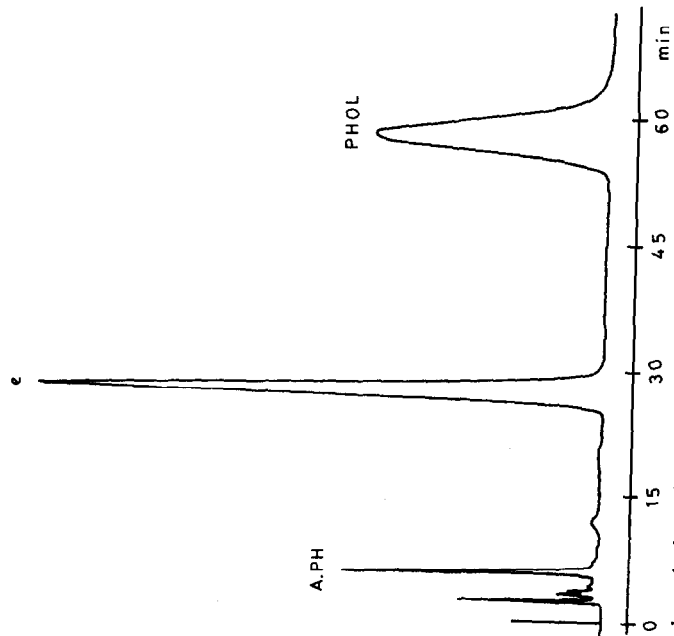


Fig. 3. Chromatogramme d'une solution de phlorétol (PHOL) commercial traité par l'hydroxyde de sodium 1 N à 20°C et hydrolysé en acide phlorétique (A.P.H). Étalon interne: acide cinnamique (e). Conditions de la chromatographie identiques à celles de la Fig. 1.

temps de rétention des trois produits a été obtenu pour un taux en acétonitrile de 22% (Fig. 1 et Tableau I). Les courbes d'étalonnage $m_i/m_e = f(A_i/A_e)$ (m_i/m_e = rapport des masses échantillon sur étalon interne; A_i/A_e = rapport des aires échantillon sur étalon interne) sont des droites d'équation:

Phloridzotide: $y_1 = 4,748x_1 - 0,06$

(coefficient de corrélation: $r = 0,998$;

erreur-type d'estimation: $\sigma_m = 0,023$)

Phlorétol: $y_2 = 2,777x_2 + 0,06$

(coefficient de corrélation: $r = 0,999$;

erreur-type d'estimation: $\sigma_m = 0,015$)

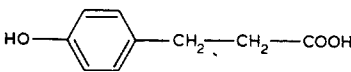
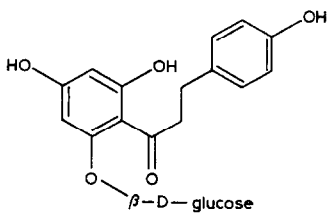
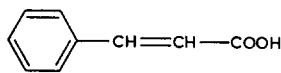
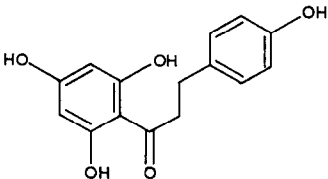
Hydrolyses basiques

Le phlorétol (5,1 mg) et le phloridzotide (5,7 mg) sont traités indépendamment

TABLEAU I

TEMPS DE RÉTENTION DES COMPOSÉS DE RÉFÉRENCE

Colonne LiChrosorb RP-18 éluee par le mélange eau-acétonitrile-acide acétique (76:22:2) avec un débit de 1 ml/min.

Composé	Formule	Temps de rétention (min)	TRR*
Acide phlorétique		6,0	0,21
Phloridzotide		13,2	0,47
Acide cinnamique		28,2	1,00
Phlorétol		59,4	2,10

* TRR = Temps de rétention relatif par rapport à l'acide cinnamique introduit comme étalon interne.

par 50 ml d'hydroxyde de sodium 1 *N* sous agitation à température ambiante (20°C) pendant 12 h. Après acidification à pH 1, extraction par l'acétate d'éthyle puis évaporation du solvant, on ajoute 1 ml d'une solution méthanolique d'acide cinnamique à 0,49 mg/ml et chacune des deux solutions est injectée en chromatographie liquide (Figs. 2 et 3).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les temps de rétention des composés de référence, acide phlorétique, phloridzozide et phlorétol sont consignés dans le Tableau I, ainsi que leurs temps de rétention relatifs par rapport à l'acide cinnamique que nous avons choisi comme étalon interne. Les chromatogrammes des solutions d'extraction de la plante sont présentés dans les Fig. 4A–D. L'étalonnage par l'acide cinnamique permet d'évaluer les taux respectifs de phloridzozide et de phlorétol extraits selon les quatre modes de traitements décrits plus haut. Les résultats sont reportés dans le Tableau II, où figure également le taux d'acide phlorétique déterminé dans un travail précédent³. Ces résultats appellent les commentaires suivants.

(1) Le phloridzozide est extrait préférentiellement au méthanol et à l'eau chaude, ce qui est en accord avec les propriétés de solubilité de ce produit. La différence des taux observée entre les extractions basique (traitement 4) et neutre (traitement 2) à température ambiante s'explique par le partage du phloridzozide entre la phase aqueuse acide et la phase acétate d'éthyle intervenant dans le traitement 4. Nous avons vérifié en effet qu'en traitant, selon 4, 5,7 mg de phloridzozide commercial, 2,5 mg seulement sont retrouvés dans la phase acétate d'éthyle. Cette extraction témoin montre de plus que le phloridzozide ne subit aucune dégradation en phlorétol et en acide phlorétique au cours du traitement que nous avons précédemment retenu³ (Fig. 2).

(2) Le phlorétol n'est observé que dans l'extrait méthanolique (traitement 1) et à l'état de traces dans l'extrait basique (traitement 4). Insoluble dans l'eau, il n'est pas mis en évidence lors des traitements 2 et 3. Soluble en milieu basique, il est extrait de la plante lors du traitement 4, mais n'est décelé qu'à l'état de traces. De la même manière que pour le phloridzozide, une extraction témoin de 5,1 mg de phlorétol commercial selon le traitement 4, conduit à 1,4 mg seulement de ce produit dans la phase acétate d'éthyle. Nous observons par ailleurs que cette hydrolyse du phlorétol fournit de l'acide phlorétique en faible proportion (Fig. 3).

(3) L'acide phlorétique n'est mis en évidence que par l'extraction en milieu basique (traitement 4). Nous avons vérifié par co-injection qu'il n'est pas présent dans les extraits méthanolique (traitement 1) et aqueux (traitements 2 et 3). D'autres chercheurs^{4–6} ont observé que cet acide pouvait se former par traitement basique du phloridzozide. Nous avons alors vérifié que l'hydrolyse du phloridzozide par la soude 2 *N* à 100°C⁶ produit bien de l'acide phlorétique. Par contre, nous avons montré (Fig. 2) que la soude 1 *N* à 20°C ne dégrade pas le phloridzozide en acide phlorétique. Nous sommes donc en mesure d'affirmer que le protocole expérimental que nous avons adopté pour l'étude des composés phénoliques des végétaux^{1–3} ne dégrade pas le phloridzozide présent dans *Loiseleuria procumbens*. L'acide phlorétique observé n'est donc pas un artefact. Le traitement que nous avons proposé² permet d'extraire la plante en milieu basique dans des conditions douces (hydroxyde de sodium 1 *N*,

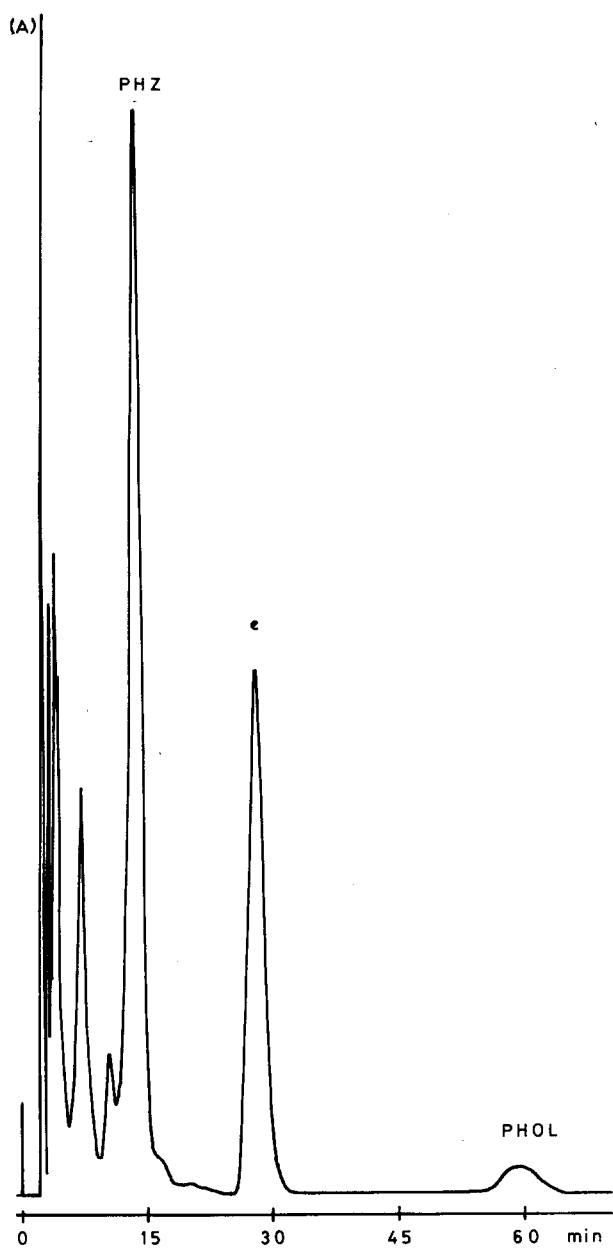


Fig. 4.

(Continué sur la p. 324)

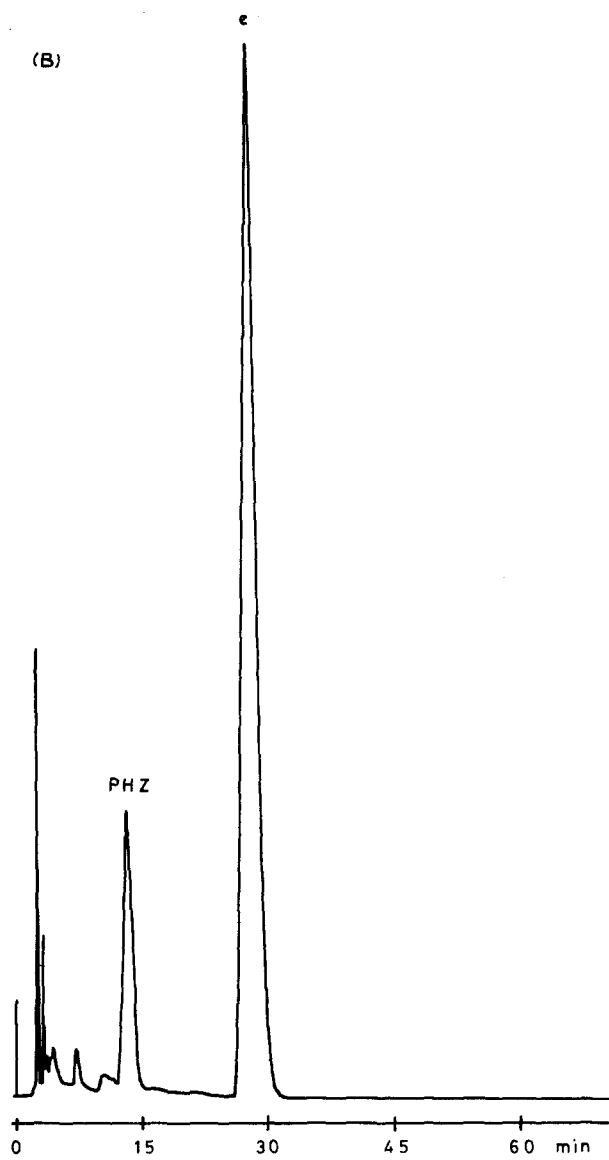


Fig. 4.

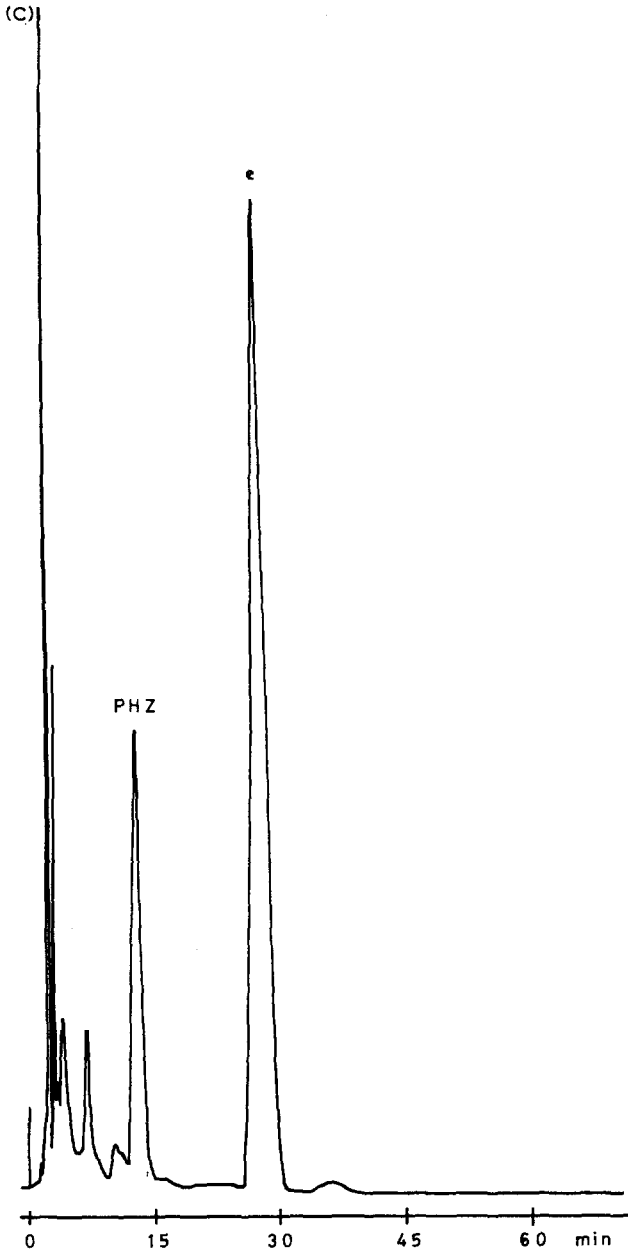


Fig. 4.

(Continué sur la p. 326)

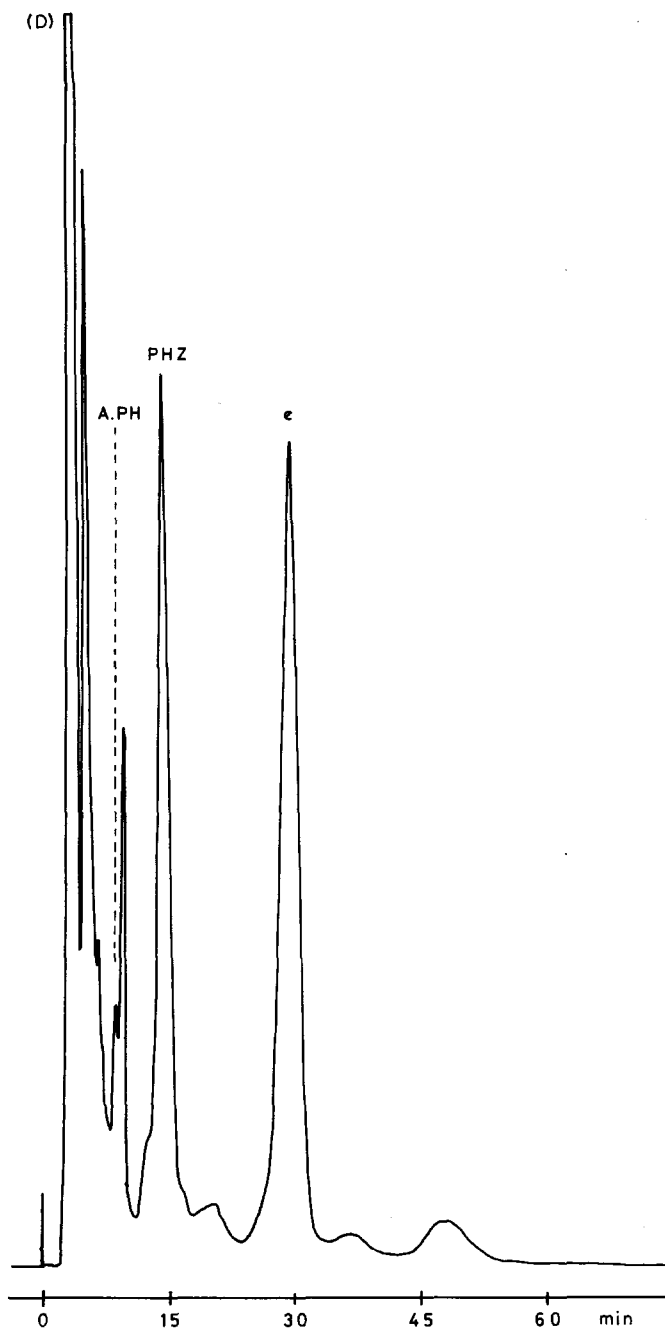


Fig. 4. Analyses de solutions de *Loiseleuria procumbens* (L.) Desv. (Ericaceae). Étalon interne: acide cinnamique (e). A, B, C et D: extraction selon traitement 1, 2, 3 et 4, respectivement. Conditions de la chromatographie identiques à celles de la Fig. 1.

TABLEAU II

TAUX DE PHLORETOL, PHLORIDZOSIDE ET ACIDE PHLORETIQUE EN mg/g DE PLANTE SÈCHE SELON DIFFÉRENTES CONDITIONS D'EXTRACTION

Traitement	Conditions		Composé identifié et dosé		
	Solvant	Température	Acide phloretique	Phloridzozide	Phloretol
1	chloroforme-méthanol (50:50, v/v)	Soxhlet	—	80	2
2	eau	20°C	—	40	—
3	eau	100°C	—	66	—
4	hydroxyde de sodium 1 N	20°C	5,5	20	traces

20°C) et de doser l'acide phlorétique effectivement présent dans l'échantillon végétal. Seule une faible partie de celui-ci pourrait provenir d'une hydrolyse basique du phlorétol dans ces conditions (Fig. 3).

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.
- 3 L. Serve, G. Combaut et L. Piovetti, *J. Chromatogr.*, 322 (1985) 257.
- 4 S. Lewak et J. Pieniazek, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 13 (1965) 569.
- 5 M. J. Grochowska, *Plant Physiol.*, 2 (1966) 432.
- 6 A. Temple, *Thèse Doctorat d'Etat ès-Sciences Pharmaceutiques*, Université de Montpellier I, Montpellier, 1978.