

Sciences de la Nature et Mathématiques, N° 14, 1977.

TRANSESTERIFICATIONS ET CONDENSATIONS CONCERNANT LES DEPSIDES ; LE COMPLEXE « DEPSIDES- CAFEINE » ; IMPLICATIONS METHODOLOGIQUES POUR L'ETUDE DES DEPSIDES DES CAFEIERS.

par Jean-Paul COLONNA*

RESUME

Le depside caféyl-3 quinique ou acide chlorogénique subit en solution hydro-éthanolique des transesterifications lentes.

Après fixation à l'éthanol bouillant puis conservation au froid à -25

Le depside caféyl-3 quinique ou acide chlorogénique subit en solution hydro-éthanolique des transesterifications lentes.

Après fixation à l'éthanol bouillant puis conservation au froid à -25°C., en milieu hydro-éthanolique, les depsides présents dans les feuilles de caféiers n'apparaissent pas à l'extraction par l'éthanol fort. Le complexe qu'ils forment avec la caféine les masque.

Un traitement au chloroforme rompt le complexe et les fait réapparaître ; il est alors possible de les doser dans leur totalité.

Le complexe correspond à un « artéfact » de conservation au froid ; il ne semble pas exister en quantité importante dans les tissus vivants ; il se forme aussi bien avec l'acide chlorogénique qu'avec ses isomères.

ABSTRACT

Transesterifications and condensations dealing with depsides ; the complex « depsides-coffein » ; methodological implications in the study of the depsides of coffee-trees.

The caffeoyl-3 quinic depside or chlorogenic acid undergoes slow transesterifications in a hydro-ethanolic solution.

After fixation with boiling ethanol then cold storage (25 degrees centigrade below zero) in an hydro-ethanolic medium, the depsides which are present in the leaves of coffee-trees do not appear in the extraction with strong ethanol. The complex they are making with coffein hides them.

A treatment with chloroform breaks the complex and makes them reappear. Then it is possible to determine the quantity of them all.

The complex corresponds to an « artefact » of cold storage ; it does not seem to exist in a great quantity in the living tissues ; it is formed as well with the chlorogenic acid as with its isomers.

* Université de Madagascar. Établissement d'Enseignement Supérieur des Sciences. Service de Botanique. B.P. N° 906. ANTANANARIVO.

Deux contraintes particulières, l'une liée au matériel végétal sur lequel j'ai généralement travaillé, l'autre liée à la nature et aux propriétés des composés chimiques étudiés, commandent le choix des méthodes qui aboutissent à la détermination quantitative de ces composés.

Les caféiers présentent la caractéristique de contenir en quantités importantes deux métabolites autres que l'acide chlorogénique : la caféine et la trigonelline. Si cette dernière ne pose aucun problème sur le plan des méthodes d'obtention, la présence de caféine entraîne, sous certaines conditions, la formation d'un complexe avec l'acide chlorogénique. Ce complexe, lorsqu'il a pu se former, masque l'acide chlorogénique, et peut en empêcher l'extraction.

Les depsides, quant à eux, s'oxydent et se condensent facilement, comme divers autres composés phénoliques, et de plus sont le siège de transesterifications qui risquent de modifier avec le temps la proportion des divers isomères dans un extrait végétal.

TRANSESTERIFICATIONS.

Plusieurs auteurs, comme BADIN, DELOFEU et GALMARINI (1962), HANSON (1962) ou HASLAM, HAWORTH et LAWTON (1963) signalent des réactions de transesterifications survenant chez divers depsides, en particulier entre l'acide chlorogénique et ses isomères ou entre divers composés gallyl-quiniques. En faisant bouillir durant trente minutes, dans un tampon à pH 7, chacun des trois isomères monocaféyl-quiniques, SCARPATI et ESPOSITO (1963) aboutissent à des mélanges en quantités égales de chacun de ces trois isomères : des artéfacts pourraient se produire pendant l'extraction à chaud de ces composés ou pendant la séparation, si elle nécessite une trop longue série de manipulations. SONDEHEIMER (1964) considère que ces réactions se produisent principalement en milieu basique : la séparation de ces corps par chromatographie sur gel de silice, avec l'acide sulfurique 0,5 N comme phase stationnaire, ne donne lieu à aucune isomérisation par déplacement de la liaison ester.

Pour ma part, j'ai réalisé la vérification suivante : après chromatographie d'un extrait hydroalcoolique de feuilles de caféier, le « spot » de l'acide caféyl-3 quinique est élué du papier par l'éthanol à 50° G.L. Une aliquote concentrée de cet éluat subit immédiatement une nouvelle chromatographie dans les mêmes conditions : on obtient un seul « spot » qui correspond bien à l'acide chlorogénique (Figure N° 1 : A, C.). On opère de la même façon, sur une autre aliquote du même éluat, après conservation entre + 5 et + 10° C., durant plusieurs mois. Ce n'est qu'au-delà de six mois que des traces des deux isomères caféyl-4 et caféyl-5 quiniques apparaissent (Figure N° 1 : B, a, b.). Ces traces repérables en lumière ultra-violette, correspondent à des quantités infimes et non dosables.

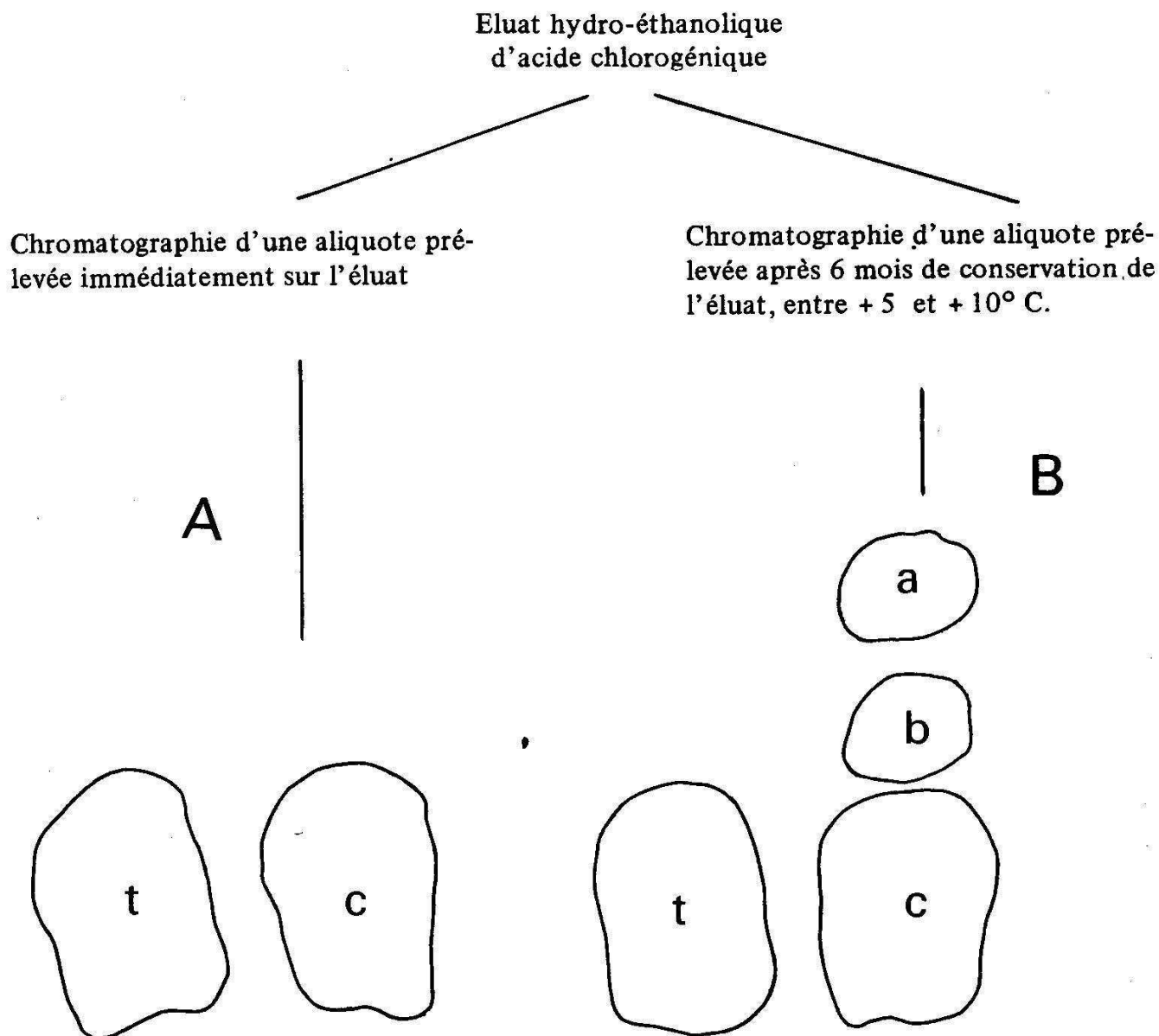


Figure n° 5 : Transesterifications lentes concernant l'acide chlorogénique ; t - «spot» d'acide chlorogénique témoin ; c - «spot» d'acide chlorogénique de l'éluat ; a - traces d'acide néochlorogénique , b - traces d'acide cryptochlorogénique.

Des réactions de transesterifications existent donc bien, mais ne se réalisent qu'à des vitesses extrêmement lentes. Le fait qu'une solution témoin d'acide chlorogénique du commerce, dans l'éthanol à 50° G.L., conservée, légèrement au-dessus de 0° C., à l'obscurité, reste identique à elle-même durant plusieurs mois, confirme cette observation.

Il résulte de ceci que la fixation du matériel végétal devra se poursuivre en milieu légèrement acide, si elle a lieu à chaud ; que l'on dispose d'un délai d'au moins six mois pour procéder à l'extraction et au dosage, si l'échantillon fixé est conservé à 55° C. En réalité, la durée de conservation au congélateur à - 25° C. peut se trouver considérablement allongée, mais, même si une expérience aboutit à un grand nombre d'échantillons végétaux immédiatement fixés, le délai de traitement sera rarement aussi long.

LE COMPLEXE « DEPSIDE—CAFÉINE », IMPLICATIONS LORS DE L'EXTRACTION.

INTRODUCTION : CONDENSATIONS ET COMPLEXES DIVERS CHEZ LE CAFÉIER.

L'acide chlorogénique peut former différents sels que GORTER (1907, 1908) a mis en évidence ou obtenu au laboratoire : chlorogénates de calcium, de magnésium, de plomb, de plomb basique, de zinc, de benzidine ou de strychnine. Mais certains caractères, comme sa participation à des complexes dits « tanniques » le rapprochent des tanins. Le principal de ces complexes, mis en évidence par PAYEN (1846, 1849, 1851) chez le grain de café, prend le nom de « chlorogénate de caféine et de potassium ». D'autres complexes semblent possibles. Certains résultats de PAYEN (1846) ou de WILBAUX (1937) laissent prévoir une affinité pour les protéines. ALIBERT (1968) montre que l'hydrolyse acide ou alcaline du résidu d'extraction libre des acides phénoliques. Il rapporte deux hypothèses sur la nature de ces combinaisons, qui pourraient provenir soit de liaisons acides phénoliques-lignines, soit de liaison acides phénoliques-protéines. Il établit que des combinaisons acides phénoliques protéines de nature différente existent chez le chêne. Certaines seraient métaboliquement actives si l'on se réfère aux travaux de EL BASYOUNI et al. (1966) sur le blé. Des combinaisons de ce genre pourraient exister avec l'acide chlorogénique. Plusieurs auteurs parlent de complexes de l'acide chlorogénique avec les mucilages ou les résines (PAYEN, 1846, 1849 ; LEMESLE, 1939, 1941), la cellulose (VAN WISSELIINGH, 1910), la subérine (DRABBLE et NIERENS—TEIN, 1906 ; POLITIS, 1948 a, 1948 b, 1948 c) ; il participerait à la constitution de la lignine et des membranes végétales (SARKANEN et LUDWIG, 1971). De même, plusieurs types de condensations entre les molécules d'acide chlorogénique elles-mêmes peuvent théoriquement se produire : — estérification entre le carboxyle en position 4 d'un acide quinique et la fonction alcool d'un autre acide quinique ; — oxydation reliant deux molécules au niveau des doubles liaisons : c'est l'acide « chlorogénique » de GORTER (1908), qui est en réalité une molécule dichlorogénique ; — condensation avec un groupement amine qui expliquerait l'affinité avec les protéines ; — polymérisation au niveau des doubles liaisons ; etc....

On ne sait si le complexe entre l'acide chlorogénique et la caféine, possède une action propre sur la physiologie animale : il accroît l'effet diurétique et abaisse la toxicité de la caféine chez le lapin (GEBHARDT, 1939) ; il inhibe l'effet de la caféine sur le muscle de grenouille (STRAUB et DOMENJOZ, 1941). Mais il peut agir là, en masquant simplement la caféine.

EXISTENCE DU COMPLEXE, CONSÉQUENCES.

Formation du complexe lors de la conservation à - 25° C.

Lors de la mise au point des méthodes d'extraction et de dosage, la vérification suivante a pu être effectuée. A la suite d'une expérience portant sur de jeunes plants de caféiers robusta et excelsa, j'ai constitué puis fixé à l'éthanol bouillant quinze échantillons de feuilles. Après six mois de conservation au

congélateur à -25°C ., broyage, prélèvement d'une aliquote du broyat et extraction, j'ai n'ai trouvé, à l'analyse, aucune trace de depsides, pour ces échantillons. Le procédé d'extraction utilisé (COLONNA, 1968) faisait intervenir l'alcool fort, puis l'éther de pétrole (P.E. = 35-50) pour la dépigmentation et le dégraissage. Sur le même matériel végétal, récemment fixé soit à froid (lyophilisation) soit à chaud (éthanol bouillant), il permettait de mettre en évidence d'importantes quantités de depsides. Les depsides existaient donc bien dans ce matériel mais se trouvaient masqués, à la suite de cette longue période de conservation à -25°C . La formation du complexe au cours de ce laps de temps et l'incapacité du solvant à l'extraire, constituaient la première explication possible de ce phénomène. En effet, le complexe n'est pas soluble dans l'alcool fort ; de plus il est facile de constater qu'une solution concentrée de caféine, parfaitement limpide à température ordinaire, donne un précipité blanc floconneux de caféine lorsqu'on le conserve au frigidaire : d'après l'index Merck il faut : 46 ml d'eau ; 5,5 ml d'eau à 80°C . ; 1,5 ml d'eau bouillante ; 66 ml d'éthanol ; 22 ml d'éthanol à 66°C . ; 5,5 ml de chloroforme pour dissoudre un gramme de caféine.

Essais de rupture du complexe.

Composition du complexe, nature des liaisons.

GORTER (1907) établit que le sel de potassium de l'acide chlorogénique cristallise avec la caféine en un complexe, dont FREUDENBERG (1920) précise qu'il est équimoléculaire (1/1) ; GORIS (1907) semble avoir reconnu un complexe du même type dans la noix de kola fraîche ; la caféine est d'ailleurs parfois utilisée pour insolubiliser les tanins. SONDEHEIMER, COVITZ et MARQUISSE (1960) confirment qu'un excès de caféine, ajouté à une solution d'acide chlorogénique, déplace le pic d'absorption de celui-ci dans l'U.V. vers les longueurs d'ondes plus élevées. Ceci est dû à la formation d'un complexe entre les deux composés ; l'étude de la partition du complexe dans un mélange eau, chloroforme et iso-octane, leur permet de conclure que les proportions sont bien de une molécule de caféine pour une molécule de chlorogénate de potassium (1/1). HORMAN et VIANI (1971), utilisant la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN), précisent que la caféine se complexe avec la portion caféique du depside, la fraction quinique restant en dehors de la région où jouent les forces attractives ; ils fournissent une image de la conformation géométrique de ce complexe en solution. Le complexe en solution se trouve dans le rapport stoechiométrique chlorogénate/caféine = 1/1. Au moins en petites quantités, il existerait dans le rapport 2/1.

L'acide chlorogénique, ses isomères, les composés du même type, vraisemblablement, ainsi que l'acide caféique, se lieraient donc à la caféine dans les solvants aqueux. Le noyau benzénique, la double liaison, les hydroxyles phénoliques contribueraient à la stabilité du complexe formé (SONDEHEIMER, 1964) mais la nature des forces attractives reste mal précisée. La publication des constantes de dissociation du complexe (SONDEHEIMER, 1964), à 25°C ., laisse prévoir, compte tenu des proportions moyennes de caféine (1,5 % MMS) et d'acide chlorogénique (5 % MMS) dans le grain de café consommable que 78 % de la base purique et 43 % du depside pourraient se lier, en cas de libre accessibilité réciproque. HORMAN et VIANI (1971) remarquent que les groupes

hydroxy et méthoxy accroissent les forces de liaison du complexe en augmentant la densité d'électrons dans le système π ; ils soulignent le rôle joué par l'eau ainsi que par l'acide quinique de la molécule qui aurait une fonction de protection de l'ensemble sans intervenir directement. La liaison hydrophobe constituerait la principale force d'attraction.

Rupture du complexe par le traitement au chloroforme.

Partant de l'hypothèse et des données précédentes, j'ai examiné les moyens de solubiliser et de rompre le complexe. Celui-ci s'extrait par les solvants aqueux et il suffira d'augmenter la proportion d'eau dans l'alcool ou d'utiliser de l'eau pour qu'il passe en solution ; l'extraction comportera un traitement aqueux de la poudre végétale.

La formation du complexe se ralentit lorsque le pH s'élève au point d'ionisation des groupes hydroxyles phénoliques (SONDHEIMER, COVITZ et MARQUISEE, 1960) ; si on ajoute un excès de soude à une solution concentrée du complexe, la caféine précipite (SONDHEIMER, 1964) et l'on peut récupérer l'acide chlorogénique. Cette possibilité de dissocier le complexe n'a toutefois pas été retenue, car, en milieu basique, diverses dégradations des depsides interviennent rapidement (RIBEYREAU-GAYON, 1968).

La relative faiblesse, généralement admise, des forces qui unissent le depside et la base purique, laisse supposer qu'un solvant pour lequel les deux constituants présenteraient des différences de solubilité marquées, permettrait de les séparer. Si on peut solubiliser 181,818 mg de caféine dans 1 ml de chloroforme à 20° C., d'après l'Index Merck, on ne peut y dissoudre que 0,059 mg d'acide chlorogénique, d'après SONDHEIMER (1964). Un traitement au chloroforme paraît alors susceptible de rompre le complexe. C'est ce que j'ai voulu vérifier au cours des essais rapportés ci-dessous (Tableau n° 1).

La vérification précédente, par la dissimulation des depsides, laisse supposer que ceux-ci forment un complexe avec la caféine, après six mois de conservation à -25° C. : ce délai ne peut-il être plus court ? L'échantillon de feuilles de caféier 2 Fe a été fixé par l'éthanol bouillant puis conservé un mois à -25° C ; après broyage, l'aliquote 2 Fe I subit le traitement d'extraction indiqué plus haut (COLONNA, 1968), avec alcool fort et sans intervention du chloroforme. Je ne trouve de depsides à l'analyse ni dans l'extrait hydroalcoolique final (Tableau n° 1, 2 Fe I a) ni dans la reprise hydroalcoolique de l'éther de pétrole de dépigmentation lavé (Tableau n° 1, 2 Fe I b). Le complexe se constitue au froid et masque les depsides en moins d'un mois, sa formation débute dès la mise en congélateur ; pour l'acide chlorogénique seul, quarante huit heures paraissent suffisantes d'après PARIS et NISHIO (1970), mais en présence d'un excès important de caféine.

Si le complexe existe et comporte la caféine et les depsides, l'apparition de ceux-ci risque de se produire après traitement au chloroforme, confirmant dès lors l'hypothèse que j'ai formulée au départ. Les résultats du traitement chloroformique auquel se trouve soumise l'aliquote 2 Fe II vont bien dans ce sens : le chloroforme intervient pour rompre le complexe en extrayant la caféine, aussi bien sur la poudre végétale contenue dans l'extracteur à filtre G 4 (procédé d'ALIBERT, 1968) que sur l'extrait éthanolique concentré dans le ballon tournant A de l'évaporateur rotatif (procédé d'ALIBERT, 1968).

Feuilles fraîches fixées à l'éthanol bouillant (échantillon 2 Fe : extraction par l'éthanol de fixation

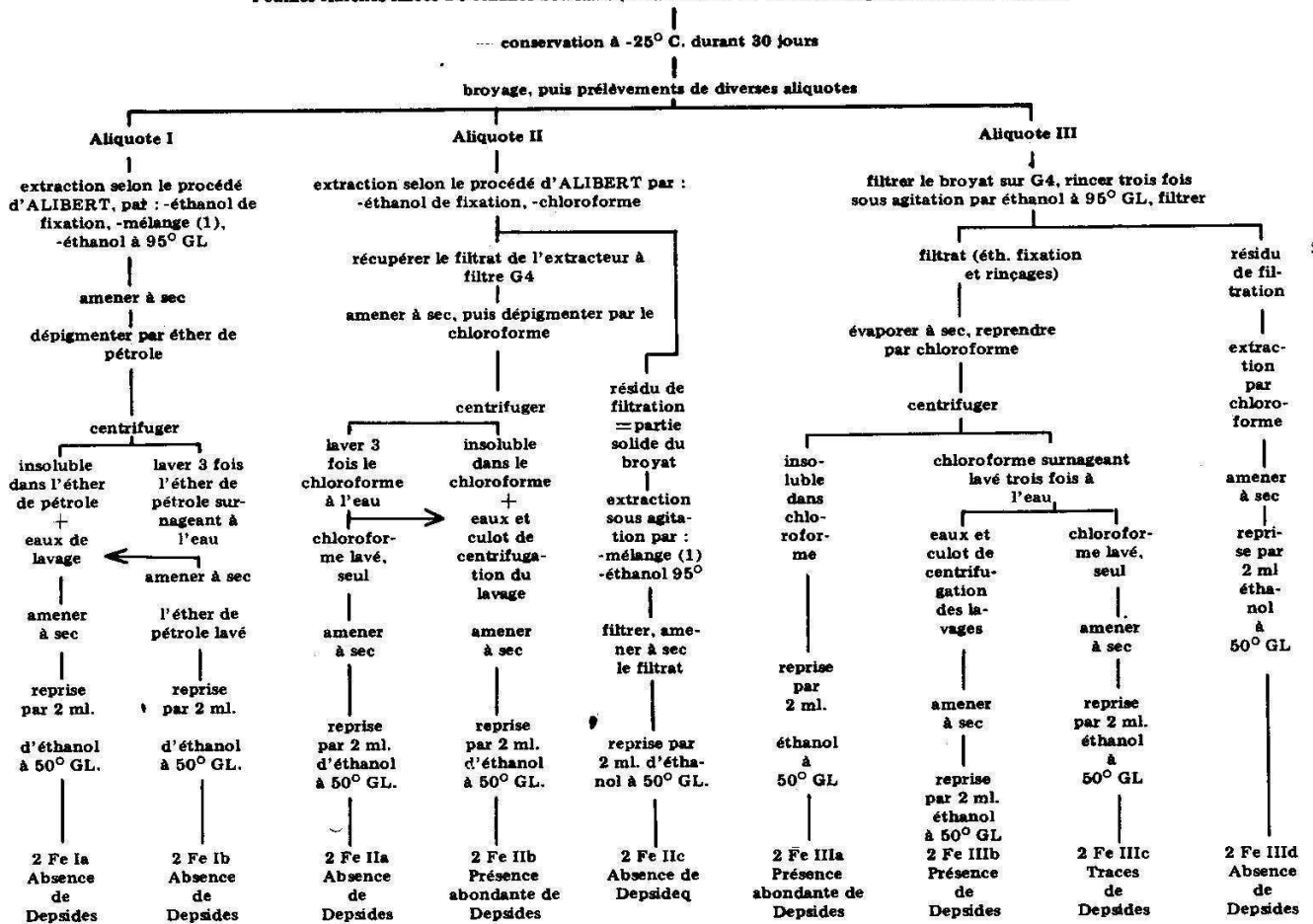


Tableau N° 1 : Mise en évidence, par le traitement au chloroforme des depsides masqués sous forme de complexe avec la caféine, après conservation d'un mois à -25°C.

— Le filtrat final retenu en A, comprend l'éthanol de fixation et d'extraction puis le chloroforme d'extraction concentrés, ainsi que les composés qu'ils ont extraits : après évaporation à sec, il est repris à nouveau par le chloroforme : cette seconde intervention de ce solvant assure la dépigmentation, le dégraissage, parachève l'extraction de la caféine et la rupture du complexe. Le ballon A contient l'insoluble de la reprise par le chloroforme, reçoit le culot de centrifugation de cette reprise et les eaux de lavage du solvant de dépigmentation ; l'ensemble est amené à sec puis repris par l'éthanol à 50° G.L. Cette fraction de l'extrait (Tableau N° 1, 2 fe II b) renferme une masse importante de depsides: le complexe a été rompu. Le chloroforme de dépigmentation, lavé trois fois à l'eau est lui-même amené à sec puis repris par l'éthanol à 50° G.L. (Tableau N° 1, 2 Fe II a) ; il ne contient aucun depside : la caféine passe entièrement et les depsides peu dans le chloroforme ; un lavage soigneux à l'eau de celui-ci paraît efficace.

— Sur le résidu solide de l'aliquote, déjà traité par le chloroforme et après filtration, l'extraction se poursuit par le mélange éthanol-acétate d'éthyle (1/1, V/V) puis par l'éthanol ; l'extrait final (Tableau N° 1, 2 Fe II c) ne comporte aucune trace de depsides : l'éthanol de fixation a, ici, extrait à peu près tous les depsides. Ce n'est pas toujours le cas ; le rapport volume de solvant/poids de l'échantillon, très favorable au cours de cette expérience, doit en réalité

se calculer au plus juste ; d'autres solvants comme le méthanol peuvent intervenir : la séquence des solvants et les quantités à utiliser pour obtenir le meilleur rendement, figurent dans le protocole d'extraction que l'on trouvera ci-après.

Ces résultats se confirment sur une troisième aliquote du broyat : 2 Fe III. L'éthanol de fixation est séparé de la partie solide de l'aliquote. Celle-ci après trois rinçages par l'éthanol puis traitement par le chloroforme aboutit à un extrait sans depsides (Tableau N° 1, 2 Fe III d). L'éthanol de rinçage joint à l'alcool de fixation est amené à sec, repris par le chloroforme puis centrifugé : l'insoluble dans le chloroforme d'une part, le culot de centrifugation augmenté des eaux de lavage d'autre part, fournissent chacun un extrait hydroalcoolique (Tableau N° 1, 2 Fe III a et 2 Fe III b) à forte teneur en depsides. Le chloroforme de dépigmentation lavé ne contient pratiquement pas de depsides (Tableau N° 1, 2 Fe III c).

Applications.

Compte tenu de la formation du complexe au froid, et de la possibilité, ci-dessus établie, de le rompre par un traitement au chloroforme, j'ai prélevé une nouvelle aliquote du broyat, pour chacun des quinze échantillons de feuilles de caféiers précédents, les ai traités par le chloroforme et obtenu effectivement la rupture du complexe avec libération des depsides antérieurement masqués (Tableau N° 2). Le détail du procédé figure dans l'exposé du protocole d'extraction : le chloroforme remplace l'éther de pétrole (P.E. 35-50) pour la dépigmentation, le dégraissage et la décaféination.

Échantillons	Quantités de depsides en milligrammes					
	Acide Chlorogénique		Acide Néochlorogénique		Acide Cryptochlorogénique	
	I	II	I	II	I	II
1	0	44,0	0	5,1	0	5,7
2	0	29,9	0	4,3	0	4,3
3	0	12,4	0	0,9	0	1,2
4	0	30,4	0	3,5	0	4,6
5	0	62,8	0	5,1	0	8,5
6	0	37,6	0	4,6	0	5,6
7	0	17,2	0	1,1	0	1,5
8	0	52,2	0	4,4	0	6,8
9	0	35,0	0	6,0	0	6,7
10	0	30,4	0	3,0	0	4,4
11	0	22,2	0	2,6	0	4,0
12	0	45,2	0	5,1	0	4,9
13	0	32,3	0	3,5	0	5,3
14	0	34,5	0	3,6	0	5,6
15	0	40,0	0	4,8	0	6,7

Tableau N° 2 : Quantités de depsides mises en évidence sur divers échantillons de feuilles de caféiers, fixés à l'éthanol bouillant et conservés durant six mois à -25° C. : I = avant rupture du complexe « depside-caféine » ;

II = après rupture du complexe par traitement au chloroforme.

Discussion.

Artéfact d'extraction.

Le complexe apparait ici comme un artéfact dû à l'extraction par l'éthanol de fixation et à la conservation à -25° C. de l'échantillon ; il se formerait plus lentement dans les conditions habituelles à la température ambiante. Il ne masque pas les depsides, donc n'est pas constitué lorsque l'extraction, selon la méthode évoquée plus haut (procédé N° 1), se situe immédiatement après la fixation, que celle-ci ait eu lieu à froid (lyophilisation) ou à chaud (éthanol bouillant), comme j'ai pu le vérifier sur caféier arabica.

Existence du complexe dans les tissus vivants.

D'après cette expérience, il semble que le complexe n'existerait pas dans les tissus de la plante, mais se formerait à l'extraction. La question est controversée. PARIS et JACQUEMIN (1966), puis PARIS et NISHIO (1970) semblent penser que l'acide chlorogénique se trouve sous forme combinée à la caféine dans le grain de café vert. Toutefois, il n'est pas prouvé que les « chlorogonoplastes » de POLITIS (1948 a) et PHOUPHAS (1963) contiennent de la caféine. D'après cet auteur, ceux-ci supportent l'acide chlorogénique que l'on peut y déceler par des colorations vitales au rouge neutre ou au bleu de crésyl ; mais les hypothèses de POLITIS restent à confirmer. MONTIES (1969) confirme toutefois que l'on trouve de l'acide chlorogénique dans les chloroplastes de plusieurs espèces d'angiospermes. Par ailleurs, on peut constater que des coupes anatomiques d'organes de caféier montées dans l'eau laisse diffuser l'acide chlorogénique, qui verdit au contact de l'air, qui provient des vacuoles (POLITIS, 1947), et qui ne parait pas là, forcément lié à la caféine. Pour EL HAMIDI et WANNER (1964) le complexe se forme à l'extraction. Si l'on ajoute un excès important de caféine dans le liquide d'extraction (PARIS et NISHIO, 1970) on modifie les conditions habituelles et il n'est pas étonnant que l'on obtienne un précipité du complexe (addition de 7,50 g de caféine pour obtenir 2 g du complexe cristallisé). Ceci nécessite d'ailleurs un séjour de quarante huit heures au réfrigérateur : l'intervention du froid, déjà signalée ci-dessus, diminue la solubilité de la caféine et favorise la précipitation.

Formation possible du complexe avec les autres depsides.

Au cours de cette expérience, je ne retrouvai, avec la première méthode d'extraction, aucun depside à l'analyse. Ceci indique, d'une part, que le complexe concerne non seulement l'acide caféyl-3 quinique mais aussi ses isomères et les autres depsides de la série hydroxycinnamique avec l'acide quinique, d'autre part que la caféine présente suffirait à compléter l'ensemble de ces composés, après un long séjour à -25° C. PARIS et NISHIO (1970) précipitent « l'acide chlorogénique normal » à « l'état de chlorogénate de potassium et de caféine ; les autres acides chlorogéniques sont extraits des eaux mères... ». Ils imaginent donc que seul l'acide caféyl-3 quinique s'unirait à la caféine, les acides caféyl-4 quinique, caféyl-5 quinique, de conformation pourtant très proche, ne pouvant le faire. On voit mal, à priori, pourquoi la caféine montrerait une telle

affinité préférentielle, dédaignant d'autres associations de types très voisins. SCARPATI et ESPOSITO (1963) obtiennent d'ailleurs un complexe cristallisé entre la caféine et l'acide néochlorogénique. SONDHEIMER (1964) considère en outre que l'acide chlorogénique, ses isomères et l'acide caféique en solution aqueuse ne présentent que de faibles différences en ce qui concerne leurs capacités respectives à se complexer avec la base purique. De plus, HORMAN et VIANI (1971), présentant diverses constantes d'association, établissent que la force du complexe est presque aussi élevée pour les ions m-coumarate, caffeate ou 3-4 méthoxycinnamate que pour l'ion chlorogénate, elle n'est pas négligeable pour l'ion cinnamate ; l'ion quinate n'intervient que faiblement dans la liaison. Il semble bien enfin, au vu de l'expérience réalisée ici, que les composés, simples ou plus complexes de la série cinnamique, hydroxy ou méthoxycinnamique se complexent effectivement avec la caféine. Je dois toutefois ajouter que dans cette expérience, un effet d'entraînement par la précipitation de la caféine au froid me paraît devoir intervenir à côté des forces de liaisons, mesurées par HORMAN et VIANI (1971).

Proportions de depsides extraits à la fixation puis masqués.

Si le complexe n'existe pas dans les tissus de la plante, la fixation à l'éthanol bouillant aboutit à extraire presque complètement les depsides et la caféine puisque tous les depsides existant sont entièrement masqués par la suite. Ceci n'est pas incompatible avec les caractéristiques de solubilité de ces composés (Tableau N° 3). L'utilisation d'autres solvants aura pour but de faciliter, de compléter ou de rentabiliser l'extraction.

Mais la caféine, présente en quantité moindre, suffit-elle à complexer, ou à précipiter, tous les depsides que l'on trouve chez le caféier. Sans avoir développé d'investigations plus précises sur ce point, il me semble possible de concevoir qu'une molécule de caféine entraînerait, surtout après une longue période de conservation au froid, plus d'une molécule de depside. La découverte par HORMAN et VIANI (1971) de formes du complexe dans les proportions 2/1 entre depside et caféine, jointe aux possibilités de condensation des depsides entre eux, évoquées ci-dessus, laissent entrevoir une réponse affirmative, et l'existence peut être de liaisons plus laches que celles dont la force est mesurée par ces auteurs. D'autre part, l'acide chlorogénique et les depsides, en solution aqueuse peuvent former des complexes avec d'autres composés que la caféine (SONDHEIMER, 1964).

Solvants	Acide chlorogénique (1)	Caféique (2)
Méthanol	15,2	—
Ethanol	6,2	1,51
Eau	0,59	2,17
Ether sulfurique	0,12	—
Acétate d'éthyle	0,06	assez faible
Chloroforme	0,0059	18,18
Benzène	0,0033	1,0
Ether de pétrole	faible	faible

Tableau N° 3 : Solubilités comparées de l'acide chlorogénique et de la caféine, en grammes pour 100 millilitres, dans divers solvants, à 20° C.

(1) — d'après SONDHEIMER (1964), VOIGHT (1960) ; (2) — d'après l'Index Merck.

CONCLUSIONS.

Mes travaux et l'examen de la littérature mettent en évidence différents points relatifs au complexe « chlorogénate de caféine et de potassium ».

- La totalité de la caféine et de l'acide chlorogénique des cellules vivantes du caféier ne peuvent en aucun cas se trouver sous forme du complexe ; on peut penser que ce dernier n'existerait pas, ou n'existerait qu'en faible quantité « in vivo ».
- Son existence dans les tissus vivants des plantes du genre *Coffea* n'est donc pas certaine.
- Au moins en grande partie, ce complexe apparait comme un « artéfact » obtenu lors de la fixation, de la conservation au froid et de l'extraction.
- Le froid favorise sa formation.
- Il englobe non seulement l'acide caféyl-3 quinique, mais aussi ses isomères, les acides isochlorogéniques et l'acide ferulyl-quinique ; il est vraisemblable que d'autres depsides peuvent y participer.
- Après conservation au froid en milieu hydroalcoolique d'échantillons végétaux provenant de caféiers, il est indispensable de rompre le complexe si l'on envisage de doser les depsides ; le traitement provoquant cette rupture sera utilisé sur tous les échantillons de caféier par précaution et par souci de normalisation du protocole d'extraction.
- L'utilisation de chloroforme, dans les premiers stades de l'extraction, permet de satisfaire à l'impératif précédent.
- Une méthode d'extraction plus générale que celle utilisable sur du matériel végétal récemment fixé (COLONNA, 1968-1969) a pu être mise au point d'après ces résultats. Je l'exposerai par ailleurs.

BIBLIOGRAPHIE

- ALIBERT G., 1968.— Les acides phénoliques chez *Quercus pedunculata* Ehrh., Thèse Doct. Spécialité, 1968, Toulouse.
- BADIN P., DEULOFEU V. et GALMARINI O.O., 1962.— Chlorogenic acid and chlorogenic like acids in « mate » (*Ilex paraguariensis*, St.Hl.). Chem. and Industry, 1962, 257.
- COLONNA J.P., 1968.— L'acide chlorogénique chez les végétaux ; cas du caféier. Rapport de D.E.A., Toulouse, 1968, 34 p.
- DRABBLE et NIERENSTEIN, 1906.— On the role of phenols, tannic acids and oxy benzoïc acids in cork formation. Biochem. J II, 96-102.
- EL BASYOUNI S.Z. et NEISH A.C., 1966.— Occurrence of metabolically active bound forms of cinnamic acid and its phenolic derivatives in acetone powders of wheat and barley plants. Phytochem., 5, 683-691.
- FREUDEMBERG K., 1920.— Heber gerbstoffe. III. Chlorogensäure der Gerbstoffartige Bestandteile der Kaffeebohnen. Ber., 53, 241-243.
- GEBHARDT H., 1939.— Caffeine — potassium chlorogenate. Arch. Exp. Path. Pharm., 191, 696-705.
- GORIS A., 1907.— Sur un nouveau principe cristallisé de la kola fraîche. C. R. Acad. Sci. Paris, 144, 1162-1165.
- GORTER K., 1907, 1908.— Mitteilung aus dem Laboratorium für Koffee am Departement für Landwirtschaft. Beiträge zur Kenntniss des Kaffees, Buitenzorg (java). Annalen d. Chemie, 358, 327-348 et 359, 217-244.
- GORTER K., 1908.— Over het Coffeine gehalte van eenige of Java gekweekte koffiesoorten, Teysmannia XIX, 12, 774.
- HANSON K.R., 1962.— The configuration of shikimic and certain biochemically related compounds. J. Chem. Ed., 39, 419-421.
- HASLAM E., HAWORTH R.D. et LAWTON D.A., 1963.— Gallotanins. VIII. The preparation and properties of some galloyl esters of quinic acid. J. Chem. Soc., 1963, 2173-2181.
- HORMAN I. et VIANI R., 1971.— The caffeine-chlorogenate complex of coffee, an NMR study. Cinquième colloque international sur la chimie des cafés... ASIC, Lisbonne, juin 1971, 102-111.
- LEMESLE R., 1939.— De l'existence d'un complexe tanin-mucilage chez certaines Myristicacées. Bull. Sc. Pharmacol., 46, N° 6, 272.
- LEMESLE R., 1941.— De l'existence de complexe tanin-mucilage chez certaines Phanérogames (*Ginkgo biloba* L.) et quelques espèces de *Myristica*. Bull. Soc. Bot. France, 88, 424-427.
- MONTIES B., 1969.— Présence de composés phénoliques dans les chloroplastes d'Angiospermes. Bull. Soc. Franc. Physiol. Veg., 15, 29-35.
- PARIS R. et JACQUEMIN M., 1966.— Sur la répartition de la caféine chez le *Coffea robusta*. Présence de théobromine dans les jeunes feuilles. Ann. Pharm. fr., 24, N° 12, 741-743.

- PARIS R. et NISHIO M., 1970.— Sur la séparation des acides chlorogéniques du café vert : *Coffea robusta* Lind.. C.R. Acad. Sc. Paris, série D, t. 270, 1465-1467.
- PAYEN A., 1846.— Premier mémoire sur le café. C.R.Acad.Sc., 22, 724-737.
- PAYEN A., 1849.— Mémoire sur le café. Ann.Chim.et Ph., (3), 26, 108-122.
- PAYEN A., 1851.— Précis de Chimie Industrielle. Hachette éd., 1851, 569.
- PHOUPHAS C., 1963.— Sur le mode de formation de l'acide chlorogénique chez les orobanches, C.R.Acad.Sci.Paris, série D., t. 257, 4009-4010.
- POLITIS J., 1947.— Sur une nouvelle méthode concernant la localisation microchimique de l'acide chlorogénique et des tanins dans les plantes. C.R. Acad.Sci. Paris, 225, 954-956.
- POLITIS J., 1948 a.— Recherches cytologiques sur le mode de formation de l'acide chlorogénique. Rev.Cyt.Cytophysio.Vég., Paris, X, 229-235.
- POLITIS J., 1948 b.— Du rôle de l'acide chlorogénique dans la formation des membranes subérifiées. Rev.Cyto. et Cytophysio. Vég., Paris, X, 232-233.
- POLITIS J., 1948 c.— Du rôle de l'acide chlorogénique dans la cicatrisation des blessures et dans la défense de la plante contre les parasites. Rev. Cyto. et Cytophysio.Vég., Paris, X, 234-235.
- RIBEYREAU-GAYON P., 1968.— Les Composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, 1968, 254 p.
- SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H., 1971.— Lignins ; occurrence, formation, structure and reactions. Wiley Interscience Ed., London, 1971.
- SCARPATI M.L. et ESPOSITO P., 1963.— Neochlorogenic acid ans « Band 510 » structure. Tetrahedron letters, 18, 1147-1150.
- SONDHEIMER E., COVITZ F. et MARQUISEE M.J., 1961.— Association of naturally occurring compounds : Chlorogenic acid-caffeine complex. Arch.Biochem. et Biophys., 93, 63-71.
- SONDHEIMER E., 1964.— Chlorogenic acid and related depsides. Bot. Review., 30, 667-711.
- STRAUB J. et DOMENJOZ R., 1941.— Further investigation of caffeine contracture of isolated frog muscle. Arch.Exp.Path.Pharm., 198, 79-86.
- VAN WISSELINGH, 1910.— On the tests for tanning in the living plant on the physiological significance of tannin. Proc.K.Akad.Wetensch.Amst., 1910, pp. 265-705.
- WILBAUX R., 1937.— Recherches préliminaires sur la préparation du café par voie humide, INEAC, série techn., 13, 50 p.