

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PLANTES MEDICINALES TUNISIENNES  
IDENTIFICATION DES ACIDES PHENOLS DE GLOBULARIA ALYpum L.  
PAR C.C.M. BIDIMENSIONNELLE ET H.P.L.C.

Par B.\* BEN HASSINE, AM. BUI et Z. MIGHRI

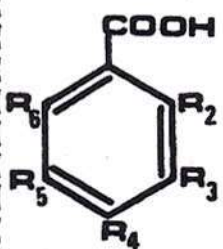
Faculté des Sciences et Techniques - Département de Chimie - MONASTIR - Tunisie

RESUME : L'étude a porté sur les feuilles, les tiges et les racines de Globularia alypum L. Dix acides phénols ont été identifiés, dont huit par C.C.M. bidimensionnelle et les autres n'ont pu être identifiés que par H.P.L.C. en utilisant la technique de l'étalon interne en phase inverse. La présence de sept de ces acides n'avait jamais été signalée auparavant.

INTRODUCTION

Au cours de l'étude chimique de Globularia alypum L. Nous avons étudié sa teneur en acides phénols libres et combinés.

Tableau I : Acides benzoïques

Formule générale	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	Dénomination usuelle
	H	H	H	H	H	Benzoïque
	OH	H	H	H	H	Salicylique
	H	OH	H	H	H	m-hydroxybenzoïque
	H	H	OH	H	H	p-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	H	Protocathéchique
	H	OH	H	OH	H	α-résorcylique
	OH	H	OH	H	H	β-résorcylique
	OH	H	H	H	OH	γ-résorcylique
	OH	H	H	OH	H	gentisique
	H	OH	OH	OH	H	gallique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	vanillique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Syringique

\* Ce travail fait partie de la thèse de 3<sup>ème</sup> Cycle de M<sup>r</sup> Béchir ben Hassine

Trois acides phénols avaient déjà été identifiés dans les feuilles (1) par C.C.M. Ce sont les acides caféïque, paracoumarique et férulique.

Les acides phénols les plus répandus dans le règne végétal sont les acides benzoïques tableau I et les acides cinnamiques tableau II.

Tableau II : Acides cinnamiques

Formule Générale	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	Dénomination usuelle
	H	H	H	H	H	cinnamique
	OH	H	H	H	H	o-coumarique
	H	OH	H	H	H	m-coumarique
	H	H	OH	H	H	p-coumarique
	H	OH	OH	H	H	caféïque
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	férulique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	sinapique

#### MODE D'EXTRACTION

Les feuilles, les tiges et les racines ont été traitées séparément. Dans chaque cas 100g de matière première ont été séchés, finement broyés puis extraits par décoction dans l'eau. L'extrait aqueux est lyophilisé.

Le mode d'extraction des acides phénols libres et combinés est résumé dans le tableau III

Les résultats concernant la teneur en acides phénols libres et combinés par rapport au poids sec de la matière première sont rassemblés dans le tableau IV.

#### MODE D'ETUDE

Les extraits bruts des acides phénols libres et combinés ont été examinés successivement en chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (C.C.M.) puis en chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.) en utilisant la technique de l'étalon interne en phase inverse.

##### A./ Chromatographie sur couche mince bidimensionnelle

Cette technique a été utilisée par plusieurs auteurs (2 à 5) pour identifier les acides phénols d'un mélange.

Tableau III : Schéma d'extraction des acides phénols libres et combinés

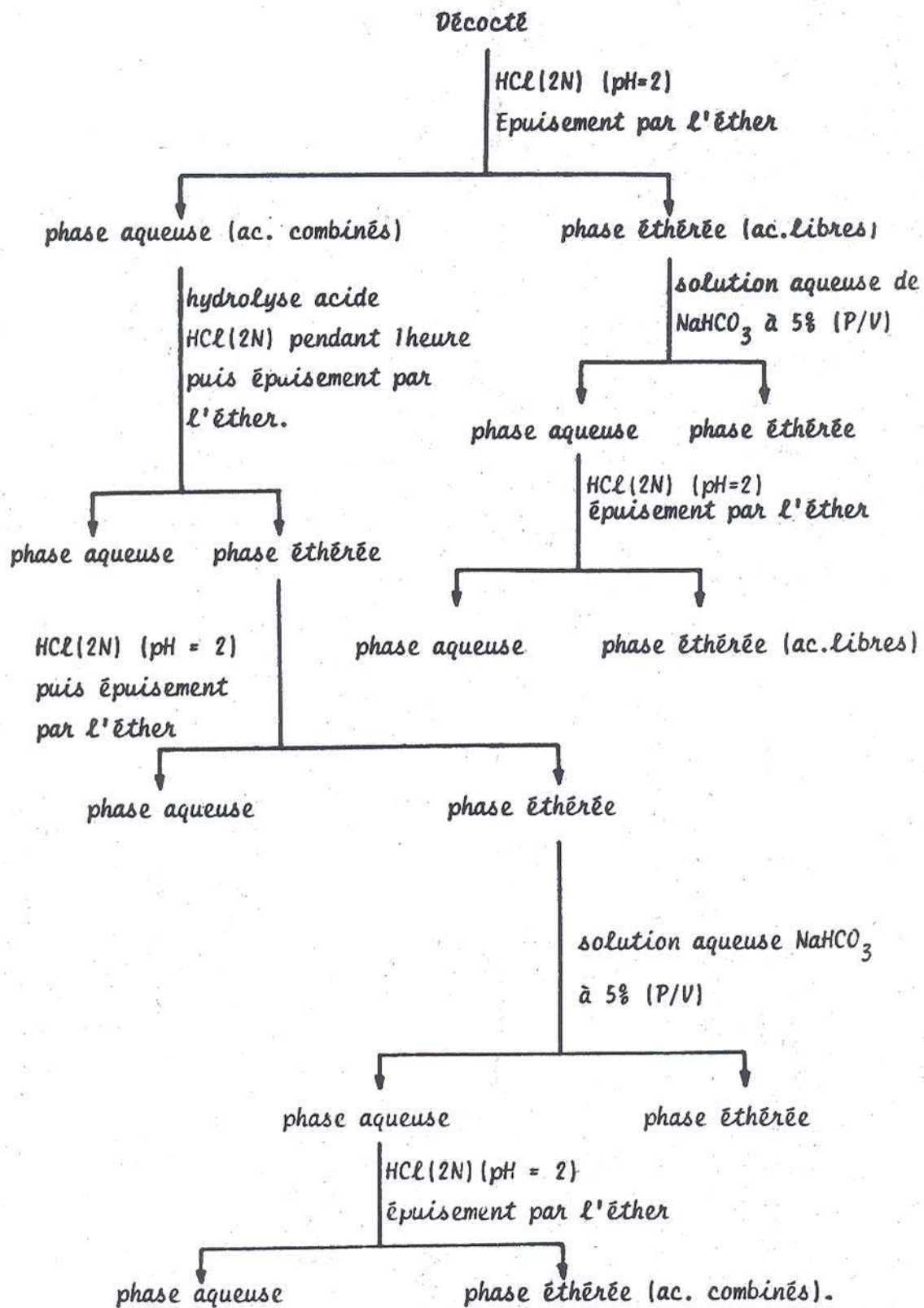


Tableau IV : Pourcentage en acides phénols libres et combinés dans les feuilles, les tiges et les racines de *Globularia alypum* L. par rapport au poids sec de la matière première.

	Feuilles	Tiges	Racines
% en acides phénols libres	0,40	0,03	0,01
% en acides phénols combinés	0,50	0,05	0,02

#### 1 - Système chromatographique

- a/ Support : plaque Merck cellulose GF<sub>254</sub>  
 b/ Eluant :  
 Dimension 1 : CHCl<sub>3</sub> - CH<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O (2 : 1 : 1)  
 Dimension 2 : CH<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O (1 : 99)  
 c/ Révélation :  
 - Absorption ou fluorescence en lumière ultraviolette à 254 et 366 nm.  
 - Première révélation par le réactif de Swain modifié\*.  
 - Deuxième révélation par une solution de NaOH à 10% (P/V) dans CH<sub>3</sub>OH.

#### 2 - Résultats et conclusion :

Les acides phénols de *Globularia alypum* L. ont été identifiés par comparaison avec des échantillons authentiques\*\*.

La composition en acides phénols libres et combinés des feuilles est la même.

Huit acides phénols (dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau V) ont été identifiés, mais nous avons été amenés à utiliser la méthode de l'étalon interne pour mettre en évidence l'acide para-hydroxybenzoïque très proche de l'acide méta hydroxybenzoïque.

La C.C.M. bidimensionnelle est suffisamment fiable lorsque les substances sont présentes en quantités relativement importantes. Nous avons soupçonné la présence de deux autres acides phénols qui n'ont pu être identifiés par C.C.M. à cause de leur trop faible teneur. C'est pour cette raison que nous avons fait appel à la chromatographie liquide haute performance.

\* Réactif de Swain modifié (4) : 1,5 ml de paranitraniline à 0,5 % dans HCl (2N). 0,5 ml de nitrite de sodium à 5 % (P/V). 20 ml d'acétate de sodium à 20 % (P/V).

\*\* Echantillons authentiques fournis par Mme Mariotte laboratoire de matière médicale Faculté de Pharmacie de Grenoble.

Tableau V :  $R_f$  et caractéristiques des huit acides phénols identifiés par C.C.M. bidimensionnelle

Dénomination	$R_f 1$	$R_f^* 2$	Révélation		
			U.V.	Avant NaOH	Après NaOH
Ac. p-hydroxybenzoïque	0,41	0,45	bleu	jaune	rouge
Ac. vanillique	0,80	0,45	bleu	jaune	violet
Ac. syringique	0,87	0,40	bleu	jaune	bleu
Ac. caféique	0,10	0,24	bleu	orange	bleu vert
		0,64			
Ac. $\beta$ -résorcylique	0,25	0,50	bleu	orange	marron
Ac. sinapique	0,80	0,52	bleu	rose	bleu clair
		0,19			
Ac. p-coumarique	0,54	0,20	bleu	jaune	bleu
		0,62			
Ac. férulique	0,88	0,18	bleu	rose	bleu vert
		0,57			

\* Les deux valeurs de  $R_f 2$  correspondent aux deux isomères cis et trans des acides cinnamiques (2), (3) et (4).

#### B./ Chromatographie liquide haute performance :

Cette technique a été utilisée en phase inverse pour identifier des acides phénols présents dans un mélange (3 et 6).

L'utilisation de la phase inversée grâce à une phase stationnaire partisol 10.ODS-2 et d'un solvant aqueux acide permet de diminuer l'ionisation des solutés lors de la chromatographie qui est responsable de l'asymétrie des pics.

#### Conditions expérimentales :

Colonne : partisol 10-ODS-2 25 cm  $\times$  4 mm  
 Eluant : dioxane - acide acétique 2% (17 : 83)  
 Débit : 1 ml/mn  
 Boucle d'injection : 20  $\mu$ l  
 Pompe : Altex Pye Unicam LC-XPS  
 Pression : 130 bars  
 Détecteur : U.V. Pye Unicam  
 Longueur d'onde : 280 nm

Enregistreur : P.M. 8252 PHILIPS  
 Vitesse de défilement du papier de l'enregistreur 10 mm/mn  
 Sensibilité du détecteur U.V. : 0,08

2°/ Technique :

Les extraits bruts obtenus à partir des feuilles, des tiges et des racines sont successivement injectés dans les conditions décrites ci-dessus. Nous avons ensuite injecté chaque acide phénol dont la présence était suspectée afin de déterminer le temps de rétention de chacun d'eux.

Enfin chaque acide phénol\*\*a été injecté en mélange avec l'extrait brut comme étalon interne et nous avons pu constater les changements intervenus dans le chromatogramme de chaque extrait brut.

3°/ Résultats et conclusion :

A titre d'exemple la figure 1 montre la séparation par HPLC d'un extrait de tiges.

Les chromatogrammes obtenus montrent que la composition en acides phénols (libres et combinés) des feuilles, des tiges et des racines est la même. Les temps de rétention des différents acides phénols ainsi que leurs abondances relatives calculées en fonction de leur absorbance à 280 nm sont consignés dans le tableau VI.

Tableau VI : Temps de rétention et abondances relatives\* des différents acides phénols identifiés dans le système indiqué

Acide phénol	: Temps de : rétention:	: Feuille %:	: Tige % :	: racines
Protocathéchique	: 7mn12s	: 4,80	: 4,56	: 14,55
p-hydroxybenzoïque	: 9mn54s	: 2,27	: 3,04	: 2,99
Syringique	: 11mn57s	: 6,13	: 8,87	: 4,85
Vanillique	: 13mn09s	: 11,33	: 10,98	: 13,25
Caféïque	: 14mn51s	: 28,80	: 25,93	: 22,20
β-résorcylrique	: 16mn15s	: 6,27	: 7,18	: 4,48
Sinapique	: 22mn42s	: 2,67	: 3,21	: 5,60
p-coumarique	: 25mn00s	: 21,60	: 15,59	: 17,35
Férulique	: 29mn30s	: 11,07	: 10,73	: 9,51
Salicylique	: 50mn48s	: 5,07	: 5,91	: 5,22

\* Les abondances relatives des acides phénols sont calculées en fonction de leur abondance à 280 nm.

\*\* Les acides caféïques, p - coumariques et férulique n'ont pas été injectés comme étalon interne car ces acides sont majoritaires et ils avaient déjà été signalés dans la plante.

1. ac. protocatéchique
2. ne correspond à aucun ac. phénol connu
3. ac. p-hydroxybenzoïque
4. ac. syringique
5. ac. vanillique
6. ac. caféïque
7. ac.  $\beta$ -résorcylique
8. ac. sinapique
9. ac. p-coumarique
10. ac. férulique
11. ac. salicylique.

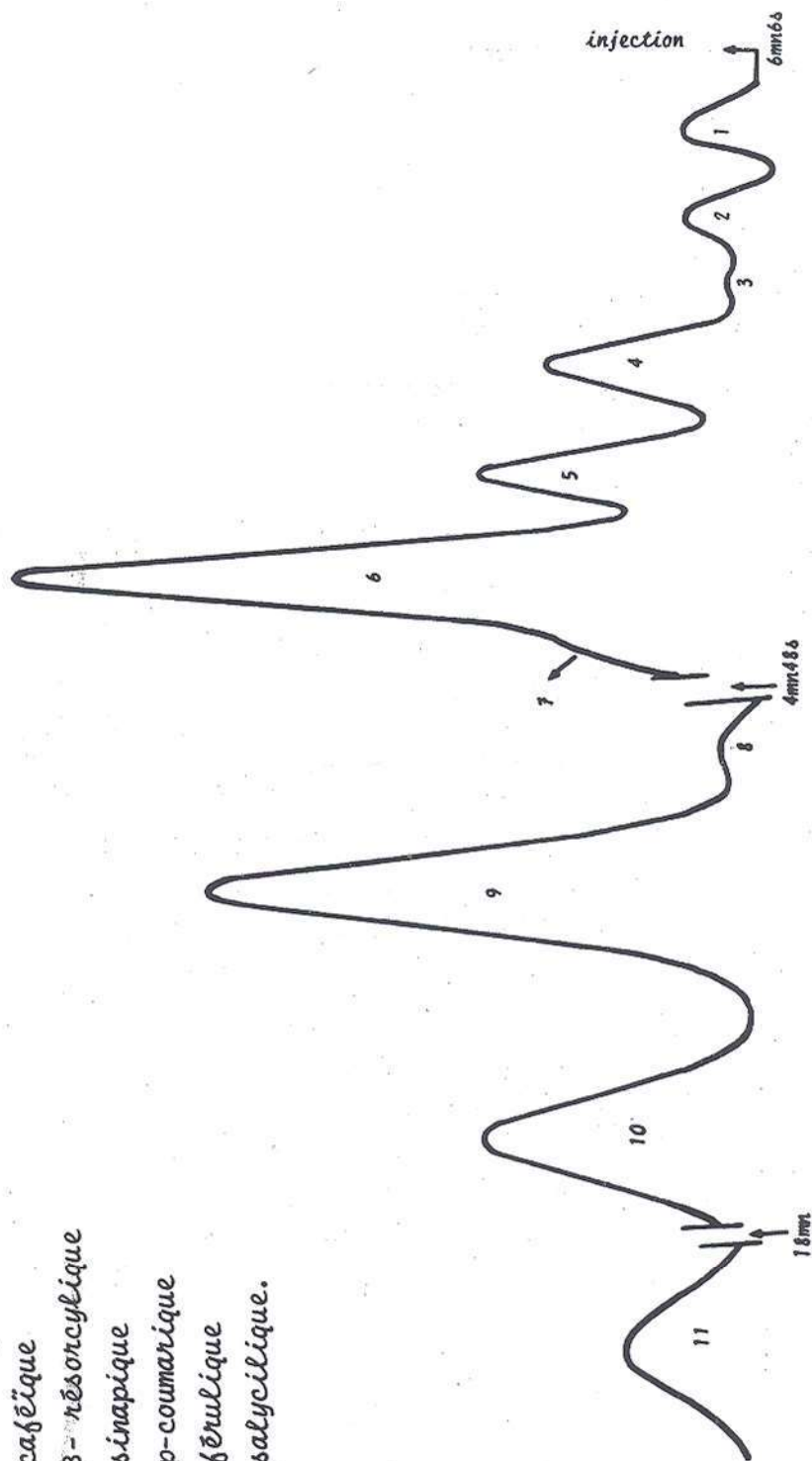


Fig 1. Chromatogramme des acides phénols des tiges.

La C.C.M. a permis d'identifier les acides phénols suivants : p-hydroxybenzoïque, syringique, vanillique, caféique,  $\beta$ -résorcyclique, sinapique, p-coumarique et férulique.

L'analyse en H.P.L.C. en phase inversée grâce à une phase stationnaire partisol 10-0DS-2 et à un solvant aqueux acide a permis une mesure relative des quantités et a en outre permis d'identifier les deux acides phénols suivants : l'acide protacathéchique et l'acide sinapique.

**Remerciements :** Nous remercions M<sup>me</sup> MARIOTTE A.M. qui nous a fourni les échantillons authentiques d'acides phénols.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Bernard P. Lallemand M. et Balansard G.  
**Plant. Med. Phytother**, 83 174-9 (1974).
  2. Pascal Ribereau - Gayon  
Les composés phénoliques des végétaux  
P. 98 - 99  
Dunod, Paris (1968).
  3. Favre F.  
Etude des acides phénols des gentianes de la section cœlanthe (C.C.M. et H.P.L.C.) D.E.A.  
Fac. de Pharm. Grenoble. Lab. mat. méd. (1979).
  4. Alibert G.  
Les acides phénols et leur métabolisme chez *Quercus pedunculata*  
Eloch. Thèse. Doct. Sciences Toulouse n° 643. (1975).
  5. M. Matjimanoli et A.M. Debelmas  
Etude de *Centaureum umbellatum* Gil  
Identification des acides phénols  
**Annales pharmaceutiques Françaises**  
35 (n° 3-4) 107-111 (1977).
  6. Favre F., Chulia A.J., Mariotte A.M. et Alary J.  
Sép. des acides phénols par chromat. en phase liquide sous pression  
**SPECTRA 2000**, n° 48, 25-27 (1979).
-