

## PROANTHOCYANES DE *CALLUNA VULGARIS* L. SÉPARATION ET CARACTÉRISATION DE CES SUBSTANCES DANS LES RAMEAUX VERTS

J. BRACHET et R. R. PARIS

Laboratoire d'Ecologie Végétale, Faculté des Sciences d'Orsay et Laboratoire de Matière Médicale, Faculté de Pharmacie de Paris

(Received 27 May; in revised form 16 July 1969)

**Résumé**—On a isolé, à partir des rameaux verts de *Calluna vulgaris* L. trois fractions proanthocyaniques qui diffèrent par leur solubilité et leur comportement chromatographique. Après traitement par l'acide chlorhydrique à chaud, l'analyse spectrale et chromatographique montre que le leucocyanidol est le constituant principal de ces fractions.

**Abstract**—From the green branches of *Calluna vulgaris* L., three proanthocyanidin fractions have been separated which differ in solubility and chromatographic behaviour. After treatment with hot hydrochloric acid, spectral analysis and chromatography show that leucocyanidin is the main constituent of these fractions.

### INTRODUCTION

LE TRAVAIL présenté s'inscrit dans une étude écologique de la biosynthèse d'un polymère phénolique de *Calluna vulgaris* L. Dans un extrait de feuilles vertes, Handley<sup>1,2</sup> avait signalé la présence d'une fraction précipitable à la gélatine et formée en partie de leucocyanidol. Nous avons pu isoler et caractériser à partir de la litière de *C. vulgaris* L. un polymère constitué essentiellement de leucocyanidol.

La recherche dans les rameaux verts, de substances représentant différents degrés de polymérisation du leucocyanidol, le choix d'une méthode de séparation de ces substances, font l'objet du travail exposé ci-dessous.

### RESULTATS

#### *Schéma de Fractionnement*

Les fractions analysées se rapportent à la méthode représentée schématiquement à la Fig. 1.

#### *Chromatographie des Fractions: $F_1 - F_2 - F_3$*

Par chromatographie sur papier à deux dimensions, en utilisant les solvants: (a) Butan-1-ol-Acide acétique-eau (4:1:2,2) et (b) acide acétique à 2%, on obtient pour  $F_1$  un spot de  $R_f$  voisins de 0,5 dans (a) et de 0,4 dans (b). Dans des conditions identiques,  $F_2$  donne des trainées (0-0,5) dans les deux solvants et  $F_3$  reste sur le point de départ.

<sup>1</sup> W. R. C. HANDLEY, *Forestry Commission Bulletin*, No. 23 (1954).

<sup>2</sup> W. R. C. HANDLEY, *Plant Soil* 15, 37 (1961).

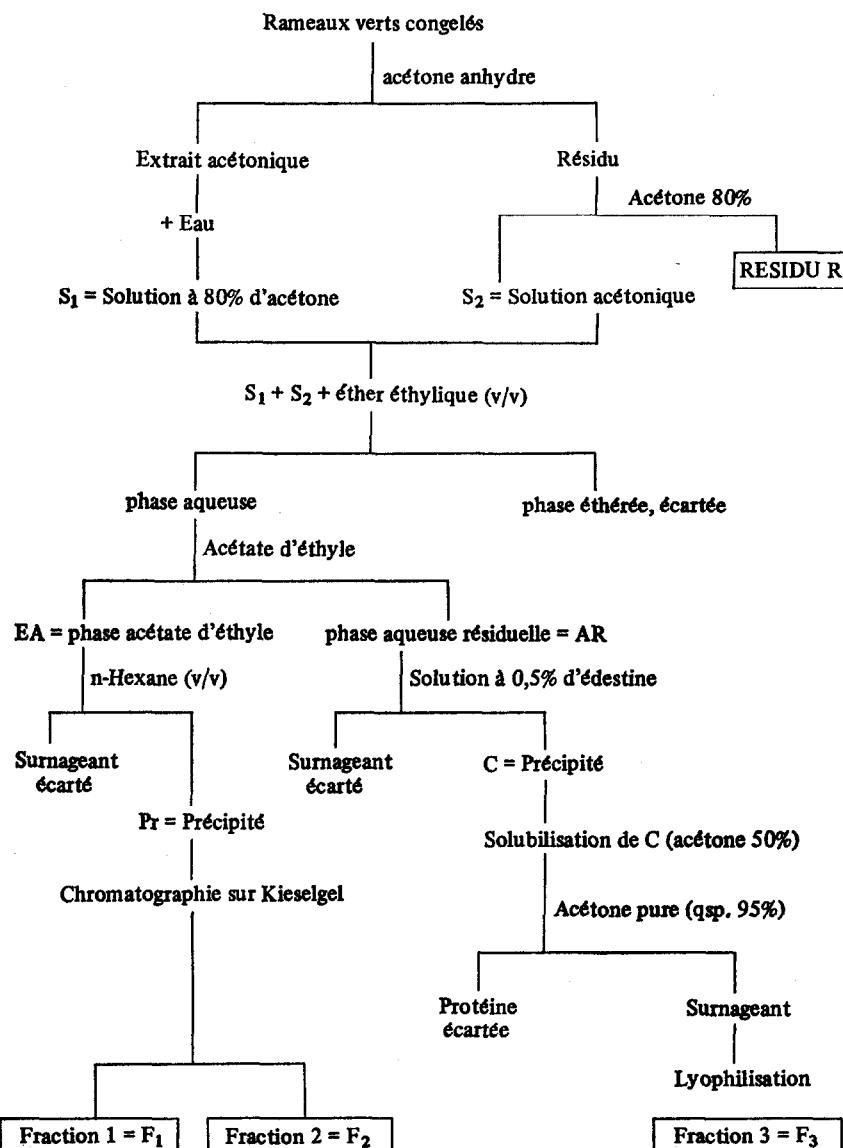


FIG. 1. SCHÉMA DU FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE RAMEAUX VERTS DE CALLUNE.

#### Précipitation par l'Hexane de $F_1$ et $F_2$

Le précipité obtenu par addition d'hexane à la solution d'acétate d'éthyle, d'après les conditions adoptées par Paris et Çubukçu,<sup>3</sup> contient, outre  $F_1$  et  $F_2$ , un certain nombre de substances phénoliques. A l'aide d'un volume relatif faible d'hexane (hexane/éthyle acétate  $< \frac{2}{3}$ ), on précipite essentiellement  $F_2$ . Par addition de volumes plus importants d'hexane (rapport précédent compris entre  $\frac{2}{3}$  et 1) on précipite  $F_1$ . Cependant, le choix de ces volumes

<sup>3</sup> R. PARIS et B. ÇUBUKÇU, *Annales pharmaceutiques françaises* 20, 583 (1962).

relatifs ne permet pas une séparation rigoureuse des deux fractions. Il a été néanmoins jugé utile de conserver ce procédé de précipitation qui évite la concentration trop poussée de la solution d'acétate d'éthyle.

En chromatographie sur Kieselgel G du précipité Pr, dans les conditions réalisées par Lewak<sup>4</sup> (Kieselgel G Merck, 1<sup>ère</sup> dimension: Chloroforme-Alcool à 96°-t-Butanol—(10:8:1 v/v)—2<sup>e</sup> dimension: Acétate d'éthyle-Acide formique (10:1 v/v),  $F_1$  a un  $R_f$  voisin de 0,8 dans les deux solvants et  $F_2$  se répartit en deux trainées de part et d'autre de l'origine.

#### *Précipitation par l'Édestine*

L'addition de quantités croissantes d'édestine à la solution aqueuse résiduelle (Fig. 1) provoque une augmentation continue de la précipitation. Les fractions obtenues dans ces conditions ont des propriétés comparables par chromatographie, électrophorèse, filtration sur gel.

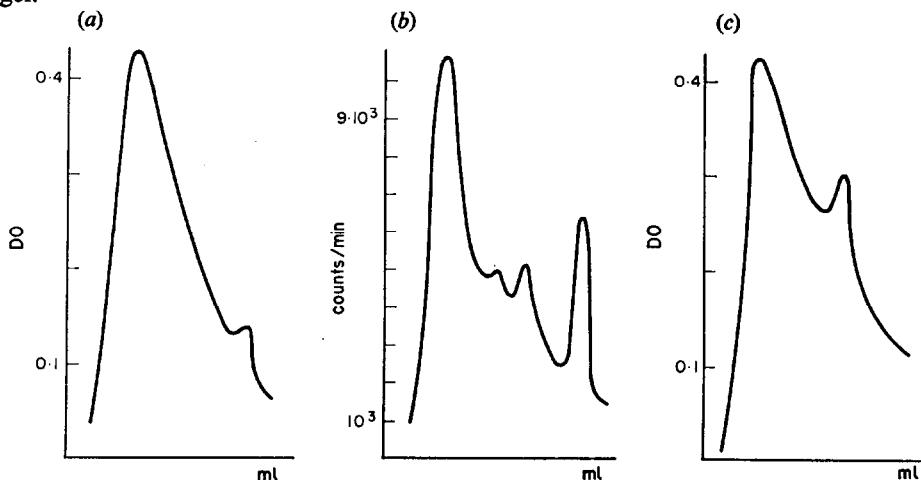


FIG. 2. FILTRATION SUR GEL SEPHADEX DE LA FRACTION  $F_3$ .

(a) et (b): Sephadex G 50. Solvant c. (c): Sephadex LH20. Solvant d (voir partie expérimentale).

Par électrophorèse sur papier (solvant c, 10 V/cm),  $F_3$  migre vers l'anode (environ 3 cm/h), en une fraction homogène.

Par filtration sur Sephadex G 50 (solvant c) on obtient un pic unique si l'élution est suivie par mesure de la DO dans l'u.v. (Fig. 2a). Cependant, la filtration de cette substance après incorporation de  $^{14}\text{CO}_2$  dans des rameaux verts de *Calluna vulgaris*, fait apparaître deux pics d'élution principaux si on mesure la radioactivité des fractions éluées (Fig. 2b). La séparation sur Sephadex LH20 (solvant d) permet également de recueillir deux fractions (Fig. 2c).

En l'absence de substance de référence, on n'a pas cherché à apprécier le poids moléculaire de  $F_3$  (la dialyse contre l'eau distillée entraîne une perte de poids d'environ 40%).

#### *Spectrophotométrie de $F_1$ et $F_3$*

Les solutions dans l'éthanol de  $F_1$  (obtenue par élution du spot correspondant sur Kieselgel) et de  $F_3$  présentent un pic d'absorption voisin de 280 nm.

<sup>4</sup> S. LEWAK, *Bull. de l'Académie Polonaise des Sciences Cl. II, Vol. XIII, No. 3, série des sciences biologiques*, 121 (1965).

*Transformation en Milieu Acide*

Les produits de transformation en milieu acide à chaud ( $\text{HF}_1$ ,  $\text{HF}_2$ ,  $\text{HF}_3$ ) ont été caractérisés par chromatographie sur papier et analyse spectrophotométrique. Le tableau 1 résume les résultats de la chromatographie sur papier de ces substances. Les spectres d'absorption des solutions de  $\text{HF}_1$ ,  $\text{HF}_2$ ,  $\text{HF}_3$  dans l'alcool éthylique à 0,1% d'HCl sont très comparables à celui de la cyanidine obtenu dans les mêmes conditions<sup>5</sup> (maximum: 548 nm).

TABLEAU 1.  $R_f$  DES PRODUITS  $\text{HF}_1$ ,  $\text{HF}_2$ ,  $\text{HF}_3$ . CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE SUR PAPIER

Solvants		$F_1$	$F_2$	$F_3$
Acide acétique	30			
Acide chlorhydrique	3	0,50	0,48-0,50	0,50; 0,32 (traces)
Eau	10			
Acide formique	5			
Acide chlorhydrique	2	0,30	0,30-0,32	0,32; 0,20 (traces)
Eau	3			
Acide acétique	60			
Eau	40	0,60	0,60	0,62; 0,50 (traces)

## DISCUSSION

Les résultats exposés ci-dessus montrent que les proanthocyanes des rameaux verts de *Calluna vulgaris* L. se répartissent entre trois fractions principales dont le leucocyanidol est le constituant majeur. Dans les conditions adoptées, il n'a pas été décelé de catéchine parmi les produits d'hydrolyse. Un proanthocyanine, dont la dégradation en milieu acide ne donne également que de la cyanidine, a été isolé à partir de l'écorce de la tige de *Rhododendron grande*.<sup>6</sup>

Les propriétés de solubilité et le comportement chromatographique des substances séparées permettent de considérer qu'elles appartiennent à des degrés de polymérisation différents. Le  $R_f$  de  $F_1$ , en chromatographie sur papier, dans les conditions citées, est celui d'une flavane monomère ou d'une biflavane.<sup>7-10</sup> La fraction  $F_2$  peut représenter un degré de polymérisation intermédiaire ( $2 < n < 10$ ).<sup>10</sup> La fraction  $F_3$  est constituée pour 60% environ de substances d'un poids moléculaire supérieur à 5000 ( $10 < n < 20$ ).

Le résidu non extractible (R. Fig. 1) n'a donné que des réactions faiblement positives pour les plantes analysées. Par l'emploi de techniques plus poussées nous avons constaté qu'il est possible d'obtenir un plus grand nombre de fractions. Nous avons jugé utile de ne retenir que les trois principales, étant donné le caractère physiologique du travail entrepris.

<sup>5</sup> P. RIBEREAU-GAYON, *Les composés phénoliques des végétaux*, Dunod, Paris (1968).

<sup>6</sup> T. R. SESHADRI, *Journal of Indian Chemical Society* **44**, No. 7 (1967).

<sup>7</sup> L. L. CREAMY et T. SWAIN, *Nature* **208**, 151 (1965).

<sup>8</sup> S. LEWAK et A. RADOMINSKA, *Roczniki Chemii, Ann. Soc. Chim. Polonorum* **39**, 1839 (1965).

<sup>9</sup> V. C. QUESNEL, *Phytochem.* **7**, 1583 (1968).

<sup>10</sup> D. G. ROUX et S. R. EVELYN, *Biochem. J.* **69**, 530 (1958).

## TECHNIQUES

## —Fractionnement

*Matériel.* Rameaux latéraux + feuilles vertes de *Calluna vulgaris* L.

*Obtention de l'extrait brut.* On a préféré effectuer l'extraction à froid, comme le préconise Haslam.<sup>11</sup> Le matériel est projeté, aussitôt après prélevement, dans de l'azote liquide puis transvasé dans un mortier refroidi où on le broie. La poudre, reprise quantitativement est introduite dans un pot (nylon) de broyeur Dangoumeau, où elle est épuisée par agitation, successivement par de l'acétone anhydre glacée, puis de l'acétone à 80%. La fin de l'extraction est vérifiée par addition d'une fraction aliquote au réactif  $\text{FeCl}_3/\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_4$  (obtenu par mélange, à volumes égaux, de deux solutions aqueuses à 1% de chacune de ces substances).

Les fractions à l'acétone anhydre sont rassemblées et concentrées (toutes les concentrations s'effectuent dans un évaporateur rotatif, sous vide et à une température n'excédant jamais 30°) jusqu'à un faible volume, puis additionnées d'eau, de façon à obtenir une solution à 80% d'acétone.

L'ensemble de ces extraits à l'acétone aqueuse est mélangé, refroidi, puis agité en présence d'un volume égal d'éther éthylique privé de peroxydes.

La phase aqueuse ainsi obtenue, additionnée de l'eau de rinçage de la phase éthérée, constitue l'extrait aqueux brut. La phase éthérée est éliminée.

*Fractionnement de l'extrait brut.* Par agitation en ampoule à décanter on épouse la solution aqueuse par des volumes successifs d'acétate d'éthyle (cette opération doit être conduite rapidement; comme précédemment la fin est repérée par l'absence de coloration du réactif ferrique en présence de la solution acétate d'éthyle). A l'issue de cette opération, on obtient deux solutions: —Phase aqueuse résiduelle, AR; —Phase acétate éthylique, EA.

*Traitement de la solution dans l'acétate d'éthyle (EA).* NB—Les solvants et solution sont séchés sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, la précipitation a lieu à froid (4°). La solution EA concentrée est agitée pendant toute la durée de l'opération. On y ajoute goutte à goutte un volume égal de *n*-Hexane, puis on centrifuge le précipité Pr obtenu. Le surnageant est écarté.

*Fractionnement chromatographique de Pr.* Le précipité repris par de l'acétone anhydre est chromatographié en deux dimensions sur Kieselgel G. 1—Chloroforme—Alcool à 96°-t Butanol (10:8:1 v/v); 2—Acétate d'éthyle—Acide formique (10:1 v/v). On sépare ainsi les fractions 1 et 2 ( $F_1$  et  $F_2$ ).

*Traitement de la solution aqueuse résiduelle AR.* AR est concentrée jusqu'à 10 ml. On lui ajoute, en agitant en permanence, un volume égal d'une solution à 0,5% d'édestine dans un tampon acétate de pH 3,6.

Le floculat obtenu est recueilli par centrifugation, rincé à l'eau distillée, puis solubilisé dans un faible volume d'acétone à 50% d'eau (acidifiée: pH ~ 3). On précipite (12 hr) la protéine dans la solution obtenue, en amenant la teneur en acétone à 95%. Le surnageant de la centrifugation qui élimine la protéine, concentré puis éventuellement lyophilisé, représente la fraction 3 ( $F_3$ ).

## —Chromatographie sur Papier et Filtration sur Gel

Papier Arches 303. Gels Sephadex G 50 fin et LH 20.

Solvants: (a) Butan-1-ol—acide acétique—Eau (4:1:2,2 v/v); (b) Acide acétique 2%; (c) Tampon borate de sodium—soude pH 9,5—Solution A: Borate de sodium 0,05 M—Solution B: Soude 0,2 M: Tampon: (50 ml de A + 17,6 ml de B), dilués à 200 ml. (d) Méthanol—Diméthylformamide (9:1 v/v).

## —Transformation en Milieu Acide

Les fractions  $F_1$ ,  $F_2$  (prélèvement direct sur les chromatogrammes) et  $F_3$  sont introduites dans des tubes à hydrolyse contenant HCl 2 N. Les tubes sont portés 15 mn au bain-marie à 70°. Les solutions obtenues sont épousées à l'éther puis à l'alcool isoamylique. Le résidu qui résulte de l'évaporation des solutions éthérée et alcoolique est repris par l'acétone (chromatographie) ou par l'alcool à 96° (spectrophotométrie).

—Incorporation de  $^{14}\text{C}$  dans la Fraction  $F_3$ 

Des rameaux de *C. vulgaris* L. plongeant par leur base dans une solution minérale à pH acide (5,2) sont placés dans une enceinte étanche. A l'aide de  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  et d'acide lactique on réalise une atmosphère enrichie en  $^{14}\text{CO}_2$  (0,1% de  $^{14}\text{CO}_2$  dont l'activité spécifique est 20  $\mu\text{C}/\mu\text{M}$ ). L'ensemble est maintenu 96 h dans les conditions d'éclairement et de température du laboratoire.

<sup>11</sup> E. HASLAM, *Chemistry of Vegetable Tannins*, Academic Press, London and New York (1966).