

**ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE
ET CHROMATOGRAPHIQUE DES DÉRIVÉS
FLAVONIQUES ET COUMARINIQUES
DU *SOLANUM SCHIMPERIANUM* (Hochst ex A. Rich)**

par L. ANGENOT (*) (**)

Assistant

(Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège,
Directeur : Prof. A. DENOËL, 5, rue Fusch, Liège-Belgique.)

1. INTRODUCTION

L'étude du *Solanum Schimperianum*, falsification de l'*Atropa Belladonna* sur le marché européen [4], — connue également sous le nom de Belladone d'Afrique — a été entreprise dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège, depuis quelque temps.

Les résultats des recherches concernant la micrographie et la composition en acides aminés libres de cette plante ont fait l'objet de diverses publications [5] et [2]. Le présent article décrit l'analyse des hétérosides flavoniques de la plante ainsi que celle du dérivé coumarinique présent.

2. EXTRACTION ET OBTENTION DES DIVERSES FRACTIONS

Après un délipidage de la plante sèche au Soxhlet par le chloroforme, on procède à l'extraction des flavonoïdes et autres polyphénols à l'aide d'éthanol à 94°. L'éthanol est éliminé sous vide et le résidu est repris par l'eau bouillante. La phase aqueuse refroidie est alors épuisée successivement par l'éther, l'acétate d'éthyle et le n-butanol [11].

La phase étherée contient le dérivé coumarinique, identifié à l'*Aesculétine* (voir 3.2) ainsi que des traces de Kaempférol libre.

La phase acétate d'éthyle est additionnée de chloroforme qui provoque la précipitation des flavonoïdes et de l'acide chlorogénique. Ce précipité est assez abondant : 600 mgr/300 gr de plante sèche. Notre analyse (voir 3.1.h.) nous révèle qu'il est constitué en majeure partie par de l'*Astragaline*, environ

(*) Avec la collaboration technique de M. M. RÉMY, préparateur-technicien.

(**) Manuscrit reçu le 7 juillet 1969.

cinq fois plus abondante que l'*Isoquercitrin* qui l'accompagne ; le *diglycoside-3-kaempférol* ne s'y trouve qu'en très faible quantité (Essai réalisé à l'aide du densitomètre TLC Vitatron).

La phase butanolique est soumise à une distillation azéotropique tertiaire (n-butanol/benzène/eau) sous vide [1]. Le résidu contient des substances très polaires : acides chlorogéniques, dérivés d'acide caféique et d'autres acides-phénols. Leur analyse n'est pas reprise dans ce travail.

3. IDENTIFICATION DES FLAVONOÏDES ET DU DÉRIVÉ COUMARINIQUE

Nous procédons à une chromatographie préparative.

— soit sur papier Whatman n° 1 ou Schleicher et Schull 2043 b,

— soit sur couche mince de Silicagel (épaisseur de 2 mm) (Appareil DESAGA pour la chromatographie préparative).

Les bandes intéressantes (fluorisant aux U-V) sont éluées par l'alcool éthylique à 94°. Les éluats sont concentrés et servent aux déterminations suivantes :

3. 1. IDENTIFICATION DES FLAVONOÏDES.

3. 1. a. Valeurs des R_f en chromatographie.

TABLEAU 1

	Sur papier Whatman n° 1			Couche mince Silicagel Merck Hörhammer (**)
	Partridge (*)	H ₂ O	HAc 15 %	
Hétéroside I	0,66	0,15	0,46	0,77
Astragaline (litté- rature) (8), (12), (14)	0,66	0,13	0,43	0,79
Hétéroside 2	0,56	0,08	0,41	0,65
Isoquercitrin (litté- rature) (7), (12), (14)	0,56	0,08	0,42	0,65
Hétéroside 3	0,45	0,29	0,56	0,58
Diglycoside - 3 - kaempférol (litté- rature)	0,43-0,47	0,27	0,54	0,58

(*) Phase de Partridge : n-butanol/HAc/Eau 4 : 1 : 5 v/v.

(**) Phase de Hörhammer (10) : Acétate d'éthyle/Acide formique/Eau 10 : 2 : 3 v/v.

3. 1. b. Révélation des chromatogrammes aux U-V longs après pulvérisation de certains réactifs.

TABLEAU 2

	non traité	+ NH ₃	Réactif de Benedikt	Acétate basique de Pb	+ AlCl ₃	Réactif citroborique
Hétérosides 1 et 3...	brun	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune avec fluor. verte
Hétéroside 2	brun	jaune-brun	extinction de la fluorescence	orangé	jaune	jaune avec fluor. verte

Les hétérosides 1 et 3 se comportent comme des hétérosides du Kaempférol, tandis que l'hétéroside 2 se comporte comme un hétéroside de la Quercétine.

REMARQUES

1. Le réactif de Benedikt avive aux U-V la fluorescence de produits ne possédant pas un groupement ortho-diphénolique. Par contre, il éteint la fluorescence de ceux possédant un tel groupement [13].

2. Aux U-V, après pulvérisation par le réactif citro-borique, les flavonoïdes apparaissent en jaune avec une fluorescence verte. Les fluorescences bleues que l'on observe aux U-V sur les chromatogrammes d'extraits de *Solanacées* (Belladone, Jusquiame et Stramoine) traités par ce réactif doivent être attribuées à la *Scopolétine* et à divers *acides-phénols* et non à des flavonoïdes, comme cela a été dit parfois.

3. 1. c. Hydrolyse acide des hétérosides isolés.

L'hydrolyse est effectuée par l'acide sulfurique à 3 % pendant une heure au bain-marie bouillant et à reflux. Après refroidissement, on obtient un précipité (*l'aglycone*) qui sera filtré sur verre fritté et un surnageant qui, après neutralisation par le carbonate de baryum et élimination du précipité de sulfate barytique, sera concentré sous vide jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Celui-ci, repris par 1 à 2 ml de pyridine, sera chromatographié pour la recherche des sucres en présence d'oses témoins.

α) Analyse de l'aglycone

1° Valeurs des R_f en chromatographie.

TABLEAU 3

	Sur papier Whatman n° 1				CCM Silicagel Merck
	Partridge 4:1:5	Forestal	HAc 60 %	H ₂ O	Hörhammer
Aglycone des hétéros. 1 et 3	0,82	0,56	0,52	0,00	0,97
Kaempférol (réf.) et littérature	0,83	0,55	0,50	0,00	0,97
Aglycone de l'hétéroside 2	0,64	0,42	0,40	0,00	0,96
Quercétine (réf.) et littérature	0,64	0,41	0,40	0,00	0,96

2° Révélation des chromatogrammes aux U-V longs après pulvérisation de certains réactifs.

TABLEAU 4

	non traité	+ NH ₃	Réactif Benedikt	Acétate basique de Plomb	+ AlCl ₃	Réactif citro-borique
Aglycone des hétéros. 1 et 3 (comme le kaempférol)	jaune-vert	jaune	exaltation de la fluor. jaune	jaune	jaune	jaune avec fluor. verte
Aglycone de l'hétéros. 2 (comme la Quercétine)	jaune	jaune	extinction de la fluor.	orangé	jaune	jaune avec fluor. verte

3° Résultats de l'analyse spectrophotométrique U-V et visible.

TABLEAU 5

	Ethanol 94°			Idem + AlCl ₃				Idem + Acétate Na
Kaempférol de référ. .	268	325 (i)	367	271	310 (i)	350	425	△ 8 nm
Aglycone des hétérosides 1 et 3	267	325 (i)	367	270	305 (i)	350	420	△ 7 nm
Quercétine de référ. .	257		375	266	301 (i)	358	430	△ 10 nm
Aglycone de l'hétéros. 2	257		375	267	301 (i)	358	430	△ 10 nm

(i) Point d'inflexion de la courbe (épaulement).

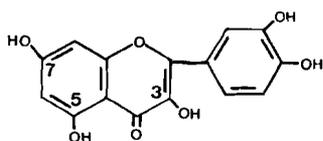
Nous nous servons d'un spectrophotomètre de Beckman, modèle DU, les cuvettes en quartz ont 1 cm d'épaisseur.

Les longueurs d'ondes (exprimées en nm) indiquent les maxima et les points d'inflexion des courbes.

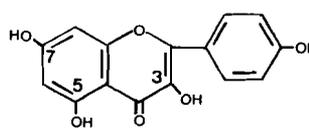
La lecture des trois derniers tableaux nous permet de tirer les déductions suivantes :

- l'aglycone des hétérosides 1 et 3 est constitué par du *Kaempférol*,
- l'aglycone de l'hétéroside 2 est de la *Quercétine*.

Ces deux produits sont représentés par les formules ci-dessous :



Formule n° 1. — *Quercétine*.



Formule n° 2. — *Kaempférol*.

Le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un chélaté avec le groupe $\text{C} = \text{O}$ et les groupements $-\text{OH}$ en position 3 et 5 (voir formules 1 et 2). Cette formation de complexes se traduit par un déplacement bathochrome de la bande d'absorption dans le visible de ± 60 nm et par un dédoublement de cette bande (voir tableau 5).

L'acétate Na rend le milieu légèrement alcalin ; seules les fonctions phénols les plus acides sont ionisées, en particulier le groupe $-\text{OH}$ en position 7. Il s'ensuit un déplacement bathochrome de la bande d'absorption dans l'U-V variant entre 5 et 20 nm. Les lectures doivent être effectuées immédiatement, vu la sensibilité des phénols aux alcalis.

β) *Analyse des sucres*.

Valeurs des R_f en chromatographie sur papier Schleicher et Schull 2043 b.

TABLEAU 6

	Acétate d'éthyle Pyridine Eau	2 1 2	Partridge 4 : 1 : 5	Fluorescence aux U-V longs après révélation (*)
Glucose (référence)	0,33		0,18	vert clair
Ose (1 ^{re} hétéros.)	0,33		0,18	vert clair
Ose (2 ^e hétéros.)	0,33		0,17	vert clair
Ose (3 ^e hétéros.)	0,33		0,18	vert clair

(*) Révélation au phtalate d'aniline.

3. 1. d. *Réactions colorées des hétérosides isolés.*

Les trois hétérosides isolés donnent les réactions suivantes :

— Shinoda : L'action de l'hydrogène naissant (Mg + HCl) provoque la formation de cyanidine avec apparition d'une coloration rouge.

Cette réaction est due au noyau phényl- γ -benzopyrone.

— Taubock [9] : Réaction oxalo-borique. Le résidu jaune intense passe dans l'éther avec une fluorescence vert jaune. C'est une réaction spécifique des flavonols.

— Réaction à l'Oxychlorure de zirconium. Il y a apparition d'une coloration jaune, instable en présence d'acide citrique. C'est une réaction caractéristique des flavonols dont l'—OH en 3 est occupé par une copule glucidique.

3. 1. e. *Spectrophotométrie dans l'U-V et le visible des hétérosides.*

Les résultats sont donnés dans le tableau 7.

TABLEAU 7

	Ethanol à 94°			Idem + AlCl ₃				Idem + Acétate Na
Hétéroside 1	267	300 (i)	351	275	300	346	397	Δ bande 2 : 10 nm
Astragaline (littérat.) (14)	267	300 (i)	350	275	302	349	400	Δ bande 2 : 10 nm
Hétéroside 2	257	300 (i)	361	272	300 (i)	362	400	Δ bande 2 : 20 nm
Isoquercitrin de référence	258	300 (i)	360	272	300 (i)	363	400	Δ bande 2 : 20 nm
Hétéroside 3	267	300 (i)	350	274	300	347	392	Δ bande 6 : 9 nm
diglyc.-3-Kaempférol : même spectre que l'astragaline (littérature)								

Le trichlorure d'aluminium forme un chélaté avec le groupe C = O et le groupement —OH en position 5. Cette formation s'accompagne d'un déplacement bathochrome de la bande 1 (visible) de ± 40 nm.

Par sa légère alcalinité, l'acétate Na provoque l'ionisation de la fonction phénol la plus acide, c'est-à-dire celle en position 7 ; il s'ensuit un déplacement bathochrome de la bande 2 (U-V) de ± 10 nm pour le dérivé du Kaempférol et de 20 nm pour celui de la Quercétine.

3. 1. f. *Point de fusion.*

Appareil de Büchi (Dr TOTTOLI).

Seul l'hétéroside 1 a pu être isolé en quantité suffisante permettant la prise du point de fusion.

p. F. de l'hétéroside 1 : 205°.

L'Astragaline isolée par PARIS [12] avait les points de fusion suivants : 175-178° (tube capillaire), 185-187° (bloc de Maquenne).

Récemment Hasegawa en a isolée des frondes d'Adiantum et en a déterminé le point de fusion [8] : 208-210°.

3. 1. g. Spectrophotométrie infrarouge*.

Enregistrement des spectres par le spectrophotomètre Perkin-Elmer 221 (prisme : NaCl).

Les flavonoïdes sont examinés après pastillage dans le bromure de potassium.

— Le spectre I-R de l'hétéroside 2 est superposable à celui de l'Isoquercitrin de référence (identique à celui renseigné dans la littérature [11]).

— Le spectre I-R de l'hétéroside 1 est superposable à celui de l'Astragaline de référence. On notera de légères différences avec les valeurs renseignées par PARIS [12].

Il faut cependant souligner que ce dernier avait réalisé le spectre I-R dans une suspension de Nujol.

— *Lecture du spectre de l'Astragaline.*

γ_{\max} (exprimée en microns) = 2,85 (OH libres) ; 3,07 (OH associés) ; 3,45 (—CH = aromatiques) ; 6,09 (C = O de l'hétérocycle central) ; 6,23 (phényl) ; 7,75 (double liaison conjuguée à un cycle benzénique) ; 8,35 (= C — O) ; 8,5 cycle benzénique disubstitué en méta (dihydroxy 5 — 7) ; au-delà de 9 : hydroxyles alcooliques secondaires des sucres.

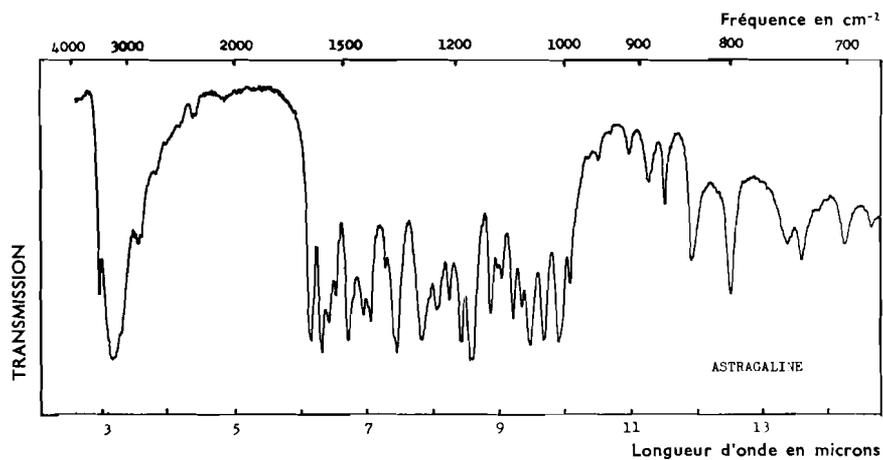


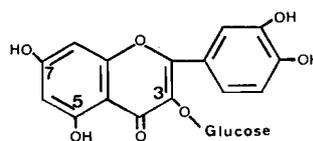
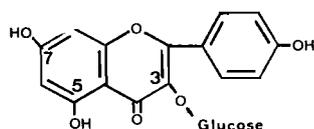
FIG. 1. — Spectre infra-rouge de l'Astragaline.

(*) Nous tenons à remercier vivement M^{me} M. DEJARDIN-DUCHESNE, assistante du Prof. C. LAPIÈRE, Service de Chimie Analytique, qui a accepté de réaliser les spectres I-R cités ci-dessus.

3. 1. h. *Conclusions.*

De ce qui précède (3. 1. a. à 3. 1. g.), nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- l'hétéroside 1 est le *monoglycoside-3-kaempférol* (Astragaline),
- l'hétéroside 2 est le *monoglycoside-3-quercétine* (Isoquercitrin),
- l'hétéroside 3 est le *diglycoside-3-kaempférol*.



Formule n° 3. — *Astragaline* Formule n° 4. — *Isoquercitrin.*

3. 2. IDENTIFICATION DU DÉRIVÉ COUMARINIQUE.

3. 2. a. *Valeurs des R_f en chromatographie.*

TABLEAU 8

	Sur papier Whatman n° 1			CCM Silicagel Merck
	Partridge	HAc 15 %	H ₂ O	Hörhammer
Dérivé coumarinique	0,80	0,56	0,28	0,96
Aesculétine (référence)	0,79	0,56	0,28	0,96
Scopolétine (référence)	0,83	0,59	0,29	0,97

3. 2. b. *Révélation des chromatogrammes aux U-V longs après pulvérisation de certains réactifs.*

TABLEAU 9

	Non traité	+ NH ₃	Réactif de Benedikt	Acétate basique de Plomb	+ AlCl ₃	Réactif citro-borique
Dérivé coumarinique	bleu clair	bleu blanc	extinction de la fluor.	jaune vert	bleu blanc	bleu
Aesculétine (référence) ..	bleu clair	bleu blanc	extinction de la fluor.	jaune vert	bleu blanc	bleu
Scopolétine (référence) ..	bleu	bleu	exaltation de la fluor.	bleu blanc	bleu	bleu

3. 2. c. *Spectrophotométrie ultra-violette et visible.*

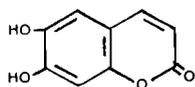
Mêmes conditions d'appareillage que précédemment (3. 1. c. et e.).

TABLEAU 10

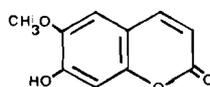
	Dans l'éthanol à 94° litt. (6)				Idem + 2 gouttes de NaOH 2 N litt. (7)			
Dérivé coumarinique	257	298	350		258	290	350	420
Aesculétine (réf- erence)	230	258	300	348	259	290	350	420
Scopolétine (réf- erence)	229	253	300	346	242	272	392	

3. 2. d. *Conclusions.*

La lecture des tableaux (8, 9 et 10) permet de conclure à la présence d'*Aesculétine*.



Formule n° 5. — *Aesculétine.*



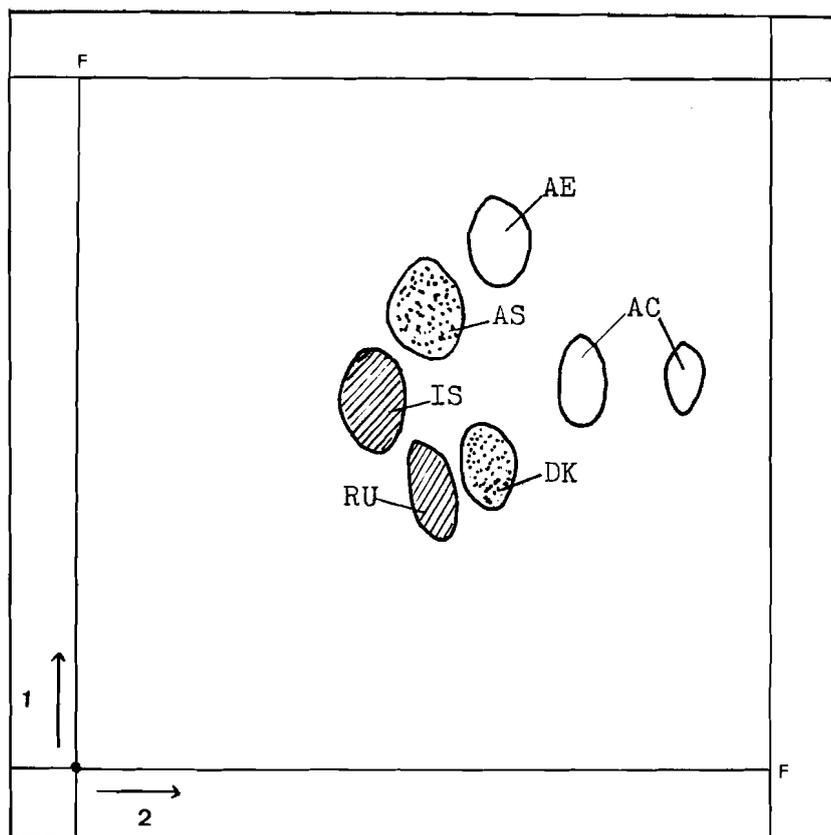
Formule n° 6. — *Scopolétine.*

4. COMPARAISON AVEC LES FLAVONOÏDES
DES SOLANACÉES MYDRIATIQUES

Dans un excellent travail publié récemment, HÖRHAMMER et ses collègues [10] font état des connaissances actuelles sur les flavonoïdes des Solanacées officinales contenant des bases tropiques.

Ces auteurs définissent un procédé rapide pour l'identification et la différenciation des teintures et extraits de ces drogues contenant des alcaloïdes identiques. Ce procédé est basé sur l'analyse des flavonoïdes, coumarines et autres produits secondaires en chromatographie sur couche mince Silicagel Merck F 254, en utilisant comme phase mobile : Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau 10 : 2 : 3 et comme réactif de révélation la solution d'acétate basique de plomb à 5 %. Bien que le *Solanum Schimperianum* ne renferme pas d'alcaloïdes dérivés du tropane — mais des gluco-alcaloïdes [4] — nous avons appliqué cette technique. Après la pulvérisation de la solution d'acétate basique de plomb, les flavonols de la série de la quercétine fluorissent aux U-V en orangé, tandis que ceux de la série du kaempférol fluorissent en jaune (cf. tableaux 2 et 4). Les coumarines (scopolétine et aesculétine) fluorissent différemment, comme le tableau 9 l'indique.

Nous avons résumé dans un tableau synoptique les principales différences dans le contenu flavonoïdique de ces plantes.



AE = AESCULÉTINE.
 AS = ASTRAGALINE.
 AC = ACIDE CHLOROGÉNIQUE (séparé en isomères cis et trans dans HAc à 15 %).
 IS = ISOQUERCITRIN.
 RU = RUTINE.
 DK = DIGLUCOSIDE-3-KAEMPFÉROL.

1 : Phase de Partridge.
 2 : HAc à 15 %.
 F : Front de solvant.

FIG. 2. — Chromatographie bi-dimensionnelle sur papier Whatman n° 1, d'une teinture de *Solanum Schimperianum*.

Les témoins internes que nous avons utilisés sont les suivants :

Aesculéline (Fluka), Astragaline (Hasegawa), Isoquercitrin (Paris), Acide chlorogénique (Fluka) et Rutine (Légia).

TABLEAU 11

	<i>Solanum Schimperianum</i>	Belladone	Jusquiame	J. d'Egypte	Stramoine
Scopolétine	0	+	+	+	0
Aesculétine	+	0	0	0	0
Astragaline	+	0	0	+	+
Isoquercitrin.....	+	0	0	+	0
Diglyc.-3-Kaempf...	+	+	+	+	0
Rutine	+	+	+	0	0
	(traces)				

La présence des différents flavonoïdes du *Solanum Schimperianum* est encore confirmée par la réalisation de chromatographies bi-dimensionnelles contenant des « témoins internes ». Elles nous ont permis de mettre en évidence la présence de traces d'un 4^e flavonoïde, dérivé de la quercétine et correspondant à la *Rutine*, comme nous le montre le diagramme de la Fig. n° 2.

5. CONCLUSIONS

Nous avons isolé et identifié dans l'herbe de *Solanum Schimperianum* une coumarine : l'*Aesculétine* et 4 flavonols : l'*Astragaline*, l'*Isoquercitrin* le *diglycoside-3-kaempférol* et la *Rutine*.

Les deux premiers flavonols cités sont abondants, ce qui nous a permis d'en dresser les spectres U-V, visible et I-R, dont nous avons précisé les caractéristiques.

Les spectres dans l'U-V et le visible sont donnés pour l'*Aesculétine* et le *diglycoside-3-kaempférol*.

Le comportement chromatographique de ces substances dans différents solvants est également étudié.

Il est possible, grâce à ces données nouvelles sur les flavonoïdes du *Solanum Schimperianum*, de différencier cette falsification des Solanacées mydriatiques classiques, ce qui apporte avec la recherche des gluco-alcaloïdes, un élément de diagnose supplémentaire.

REMERCIEMENTS

Nous voulons exprimer ici toute notre gratitude au Professeur R. PARIS de l'Université de Paris qui a accepté de mettre à notre disposition l'*Isoquercitrin* de référence et au Professeur Masao HASEGAWA de la Tokyo Metropolitan University pour la fourniture d'un échantillon d'*Astragaline*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CAMBIE (R. C.). — University of Auckland, New Zealand, Communication personnelle (1969).
- [2] DANZE (J. M.). — *J. Pharm. Belg.*, n° 1-2 (1969), p. 22-32.
- [3] DELAVEAU (P.). — *Anais da Faculdade de Farmacia da Porto* (1968), vol. 28.

- [4] DENOËL (A.). — *Pl. méd. et Phytothérapie* (1968), Tome 2, n° 3, p. 153-176.
[5] DENOËL (A.) et NIHOUL-GHENNE (L.). — *J. Pharm. Belg.*, n° 9-10 (1968), p. 503-511.
[6] GOODWIN (R. H.) and POLLOCK (B. M.). — *Arch. Biochem. and Biophys.* (1954), p. 1-6.
[7] HARBORNE (J. B.). — *Biochemical J.* (1960), vol. 74, p. 270.
[8] HASEGAWA (M.) and AKABORI (Y.). — *Bot. Mag. Tokyo* (1968), vol. 81, n° 964, p. 469-472.
[9] HÖRHAMMER (L.) und HANSEL (R.). — *Arch. Pharm.* (1953), 256-58, p. 447-452.
[10] HÖRHAMMER (L.), WAGNER (H.) und HÖLZ (J.). — *Dtsch. Apoth. Ztg.*, n° 42 (1968).
[11] LEBRETON (Ph.) et BOUCHEZ (M. P.). — *Pl. Méd. et Phytothérapie* (1967), Tome I, n° 4, p. 188-200.
[12] PARIS (R. R.) et DELAVEAU (G.). — *Lloydia* (1962), vol. 25, n° 3, p. 151-155.
[13] REZNIK (H.) und EGGER (K.). — *Zeits. für Anal. Chem.* (1961), Bd 183, p. 196-199.
[14] RIBEREAU-GAYON (P.). — *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris (1968).