

## ÉTUDE CHIMIQUE DU *DANAIS FRAGRANS GAERTN* (Rubiacées)

par R. ANDRÉ, F. BAILLEUL, P. DELAVEAU, R. R. PARIS et H. JACQUEMIN

(Laboratoire de Matière Médicale, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,  
Université René-Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France)

### RÉSUMÉ

Des feuilles ont été isolés trois hétérosides flavoniques identifiés au kaempférol-3-0 rhamnoglucoside, au quercétol-3-0 rhamnoglucoside et à un kaempférol-3-0 rhamnodiglucoside. Dans les écorces de racines se trouvent la dihydroxy-1,3 méthyl-2 anthraquinone ou rubiadine à l'état libre et sous forme d'un xyloglucoside ainsi qu'une hydroxy-1 diméthylanthraquinone. Des acides phénols de la série benzoïque et de la série cinnamique sont mis en évidence dans les feuilles, les écorces de tiges et les écorces de racines. Les stérols présents dans les écorces de tiges sont le campestérol, le stigmastérol et le  $\beta$ -sitostérol. Des iridoïdes se rencontrent dans tous les organes étudiés.

### INTRODUCTION

Le *Danais fragrans* (Gaertn.) est une espèce vivace de Madagascar, ombrophile, d'altitude moyenne (50 à 1.200 m), acidophile. Selon le cas, son port est celui d'un arbuste sarmenteux en forêt ou celui d'une plante rampante en savane. Entières, les feuilles sont opposées ; les fleurs, disposées en cymes axillaires corymbiformes, sont jaunes et odorantes à l'ombre. Le fruit est une capsule coriace. La plante jouit à Madagascar d'une réputation tonique, fébrifuge, stomachique, vulnérable et elle est employée comme agent tinctorial.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les essais préliminaires [7] ont permis de conclure à la présence d'iridoïdes dans les différents organes, de tanins, de flavonoïdes dans les feuilles, de dérivés quinoniques dans les écorces de racines et à l'absence de flavane-diols, d'anthocyanes et d'alcaloïdes.

Manuscrit reçu le 11-3-1976.

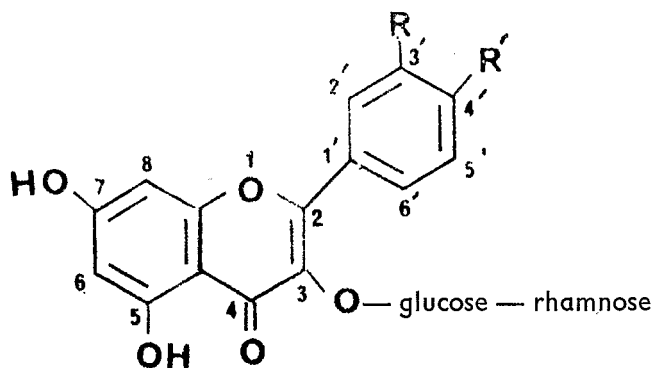
29 AOÛT 1977

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

M 8669 B. B. V.

Les flavonoïdes sont extraits selon une méthode dérivée de celle de CHA-RAUX-PARIS [8] ; la séparation de trois hétérosides est faite par chromatographie préparative sur couche mince (C. C. M.) de silice et de cellulose. L'hétéroside A présente les caractères d'un bioside (Tableau I), dérivant du kaempférol d'après son spectre UV (Tableau II) : (bande I max 352 nm, bande II max 265 nm) dont l'OH en 3 est substitué (déplacement hypsochrome de 14 nm de la bande I par rapport à la génine). Par addition de chlorure d'aluminium, il se produit un léger déplacement bathochrome de la bande I confirmant la présence d'un —OH libre en 5. Avec l'acétate de sodium, la bande II subit un déplacement bathochrome, ce qui signifie un —OH libre en 7 ; l'addition d'acide borique ne provoque pas de déplacement de la bande I, ce qui indique l'absence de groupement orthodihydroxylé en 3', 4'. L'hydrolyse de cet hétéroside A en milieu acide libère une génine identifiée au kaempférol par son spectre UV et par ses Rf en C. C. M. ainsi que deux doses identifiées au glucose et au rhamnose par C. C. M. Cet hétéroside est donc le *kaempférol-3-O rhamnoglucoside* ou *nicotifloroside* (fig. 1).



R	R'	
OH	H	Nicotifloroside
OH	OH	Rutoside

FIG. 1.

L'hétéroside B apparaît aussi comme un bioside (Tableau I) son spectre UV est caractéristique d'un hétéroside du quercétol (bande I max 350 nm, bande II max 258 nm) dont l'OH en 3 est substitué (déplacement hypsochrome de la bande I par rapport à la génine) (Tableau II) les mêmes observations que précédemment permettent de conclure à la présence d'OH libres en 5, 7, 3' et 4'. L'hydrolyse libère une génine identifiée au *quercétol-3-O rhamnoglucoside* ou *rutoside* (fig. 1).

TABLEAU I

*Rf des hétérosides flavoniques en chromatographie sur couche mince*

Nature des Solvants	eau	EGGER eau-éthanol- méthyléthylcétone- acétylacétone 13 : 3 : 3 : 1 (v/v)	PARTRIDGE n-butanol-acide acétique-eau 4 : 1 : 5 (v/v)	acide acétique-eau 15 : 85 (v/v)	Interprétation
Nature du support	cellu- lose	polyamide	cellulose	cellulose	
Hétéroside A ..	0,49	0,28	0,39	0,62	bioside
Hétéroside B ..	0,29	0,27	0,39	0,50	bioside
Hétéroside C ..	0,62	0,54	0,62	0,85	trioside

TABLEAU II

 *$\lambda_{\max}$  des hétérosides flavoniques en présence de divers réactifs*

	F. A. Bandes (nm)		F. B. Bandes (nm)		F. C. Bandes (nm)	
	I	II	I	II	I	II
	Méthanol .....	<u>352</u>	<u>265</u>	<u>360</u>	<u>258</u>	<u>346</u>
Méthanol + NaOH .....	<u>398</u>	<u>280</u>	<u>412</u>	<u>272</u>	<u>392</u>	
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> .....	<u>394</u>	<u>275</u>	<u>435</u>	275	400	272
Méthanol + acétate de sodium .	<u>384</u>	<u>275</u>	<u>405</u>	<u>270</u>	378	<u>275</u>
Méthanol + acétate de sodium + acide borique .....	350	265	<u>376</u>	260	350	265

Quant à l'hétéroside C isolé en très faible quantité, sa structure n'est pas entièrement élucidée. Par C. C. M. (Tableau I) il apparaît comme un trioside. Après hydrolyse, il fournit glucose et rhamnose et une génine identifiée au kaempférol. Ses caractéristiques spectrales sont très proches de celles du nicotifloroside. Il s'agit probablement d'un kaempférol-3-0 rhamnodi-glucoside dont la structure exacte devra être établie ultérieurement par des méthodes d'hydrolyse enzymatique.

Des dérivés anthraquinoniques sont séparés au moyen de solvants en série de polarité croissante. Seul l'extrait chloroformique fournit par concentration un précipité Pp donnant lui aussi les réactions de Borntraeger et de Brissemoret et Combes, caractéristiques des anthraquinones. Après purification selon un protocole voisin de celui prescrit par THOMSON [2], les extraits éther de pétrole et chloroforme sont rassemblés en vue d'une séparation sur colonne de silice et élution au moyen de benzène progressivement enrichi en chloroforme.

Ce procédé permet d'isoler une première anthraquinone A de caractéristiques physiques suivantes :

*Spectre UV* : EtOH : 240 ép, 245, 277, 410 nm, EtOH + NaOH : 235, 300 ép., 310, 470 nm.  
<sub>max</sub> max

*Spectre IR* : KBr : 3.395  $\text{cm}^{-1}$  (OH valence), 1.670  $\text{cm}^{-1}$  (C=O valence), 1.627  $\text{cm}^{-1}$  (C=O valence chélatée) [1], [9], 1.590  $\text{cm}^{-1}$  (C=C valence), 1.435, 1.370, 1.340, 1312  $\text{cm}^{-1}$  (CH déformation aromatique).  
<sub>max</sub>

*Spectre RMN* (DMSO) :  $\delta = 2,1 \cdot 10^{-6}$  (3 H, s, 7-CH<sub>3</sub>),  $7,2 \cdot 10^{-6}$  (1 H, s, 1 proton aromatique),  $8,0 \cdot 10^{-6}$  (4 H, m, 4 protons aromatiques).

*Spectre de masse* : m/e = 76 (22 %), 197 (15 %), 226 (25 %), 238 (40 %), M+ = 254 (100 %). Le spectre de masse donne un poids moléculaire de 254 et confirme la structure anthraquinone par les pics (M+ — 56 et m/e 76).

Le spectre de RMN avec un singulet d'intensité 3 à 2,1 ppm est compatible avec une structure méthylantraquinone. Le spectre IR avec les deux pics à 1.670 et 1.627  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique d'une structure dihydroxyanthraquinone. L'interprétation du spectre de RMN montre que ces trois substituants (1 méthyle et 2 hydroxyles) sont sur le même noyau. La disposition des deux OH en 1 et 3 est objectivée par les bandes 3.395, 1.670, 1.627, 1.340  $\text{cm}^{-1}$  en IR [1], [9]. Cette structure a pu être confirmée par l'examen du spectre UV en présence d'hydroxyde de sodium (absorption à 470 nm caractéristique d'une structure diphenol en 1,3) [1] et par l'importance du pic de masse M+ — 16. Le spectre de RMN avec le singulet d'intensité 1 à 7,2 ppm est caractéristique d'un proton en 4. Donc le méthyle est en position 2. Cette structure est identique à celle de la *dihydroxy-1,3 méthyl-2 anthraquinone* ou *rubiadine* déjà isolée de diverses Rubiacées (fig. 2).

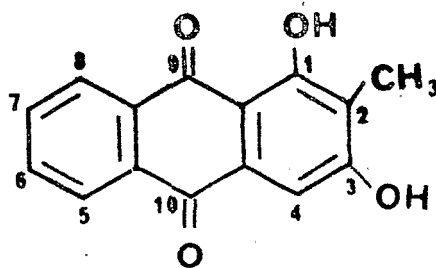


FIG. 2. — Dihydroxy-1, 3 méthyl-2 anthraquinone ou rubiadine.

D'autre part, une séparation sur colonne de silice des constituants du précipité Pp, a permis d'obtenir une seconde anthraquinone B. Elle présente les caractéristiques physiques suivantes :

*Spectre UV* : EtOH : 240 ép., 245, 278, 320 ép., 410 nm. EtOH + NaOH :  
240 ép., 248, 315, 480 nm.  
maxmax

*Spectre IR* : KBr : 3.220  $\text{cm}^{-1}$  (OH valence), 1.675  $\text{cm}^{-1}$  (C=O valence),  
1.630  $\text{cm}^{-1}$  (C=O valence chélatée) [1], [9] 1.275  $\text{cm}^{-1}$ .

*Spectre de masse* : m/e 76 (5 %), 139 (12 %), 151 (5 %), 168 (10 %), 196  
(20 %), 224 (10 %), M+ = 252 (100 %).

D'après ce dernier spectre, il s'agit bien d'une structure de type anthraquinone (pics M+ — 28, M+ — 56, et m/e 76) et son poids moléculaire est de 252. Les deux pics à 1.675 et 1.630  $\text{cm}^{-1}$  en IR sont caractéristiques d'une hydroxy-1 anthraquinone. L'examen du spectre de masse et du spectre IR permet d'identifier cette anthraquinone B à une *hydroxy-1 diméthylanthraquinone*.

Enfin l'extrait éther éthylique contient à l'état pur une troisième anthraquinone dont la forte polarité mise en évidence par des études chromatographiques, fait supposer une nature hétérosidique. Après hydrolyse acide, cette substance fournit glucose et xylose ainsi qu'une génine identifiée par C. C. M. à la rubiadine précédemment isolée. Le pic m/e 254 dans le spectre de masse de l'hétéroside fournit un argument dans le même sens. Cette anthraquinone est donc un *xyloglucoside de la rubiadine*.

D'autres produits polyphénoliques, les acides-phénols, sont extraits par l'eau bouillante et leur étude se fait sur un infusé à 10 %. Les formes libres sont extraites par l'éther éthylique à pH 1, les formes combinées sont obtenues de la même manière après hydrolyse préalable en milieu alcalin. Chacun des extraits est étudié par C. C. M. de silice ou de cellulose dans différents solvants en présence de témoins internes et externes. D'une part, il a été ainsi possible de mettre en évidence des acides phénols de la série benzoïque (acides p. hydroxybenzoïque, vanillique et gentisique) sous formes libre et combinée dans les écorces de tiges, les écorces de racines et les feuilles. D'autre part des acides phénols de la série cinnamique (acide p. coumarique, caféique et férulique) existent seulement sous forme combinée et uniquement dans les feuilles.

Enfin, a été effectuée l'étude des constituants de l'insaponifiable des écorces de tiges. Celui-ci a été préparé suivant la technique de la Pharmacopée française, VIII<sup>e</sup> édition, à partir d'un extrait éthéropétrolique. Après extraction de l'insaponifiable par l'éther éthylique, les stérols ont été isolés par C. C. M. de silice préparative, puis identifiés par chromatographie en phase gazeuse, comparativement avec des stérols témoins [3]. Ainsi ont été identifiés le campestérol, le stigmastérol et le  $\beta$ -sitostérol, présents dans les proportions respectives de 34,9 ; 26,9 et 38,2 %.

La réputation de plante fébrifuge, tonique, vulnéraire et stomachique ne peut être justifiée par la nature des constituants isolés jusqu'à ce jour. La présence d'anthraquinones explique par contre l'emploi des racines comme agent tinctorial.

Les iridoïdes et les anthraquinones du type rubiadine à hydroxyles localisés uniquement sur l'un des cycles du noyau anthracénique peuvent être considérés comme des critères de chimiotaxinomie pour les Rubiacées.

L'étude approfondie des iridoïdes en cours permettra peut-être de préciser la position du genre *Danais* dans la tribu des Cinchonées.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### FLAVONOÏDES.

#### 1. — *Extraction et isolement* :

Les feuilles réduites en poudre (400 g) sont extraites dans un appareil de Soxhlet successivement par l'éther de pétrole, puis l'alcool éthylique. L'extrait alcoolique (4 l) est concentré au dixième sous pression réduite à 50 °C. Le résidu est repris par l'eau bouillante (700 ml) ; l'extrait aqueux obtenu est filtré à chaud sur verre fritté n° 3 et kieselguhr. Après une nuit à + 4 °C, il est épuisé successivement par l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle, le n-butanol (100 ml × 5 fois). Chacun des extraits organiques est privé de solvant par distillation et le résidu est repris par 10 ml d'alcool éthylique.

Les extraits dans l'acétate d'éthyle et le n-butanol sont soumis à une première C. C. M. préparative (silice 0,5 mm ; solvant I : acétate d'éthyle-alcool éthylique-eau 100 : 16,5 : 13,5 (v/v) ; élution des bandes de Rf respectifs (0,25 ; 0,35 ; 0,45) par l'éthanol). Chacune des fractions est purifiée par une nouvelle chromatographie préparative (cellulose : 0,5 ; solvant II : acide acétique : eau 5 : 95 (v/v) ; élution des bandes par l'éthanol).

#### 2. — *Identification des hétérosides* :

— C. C. M. : a) de silice préétalée MERCK (0,25 mm), solvant I. b) de cellulose préétalée MERCK (0,25 mm), solvant : acide acétique 15 : 85 (v/v). c) de polyamide 11 F 254 nm sur feuilles d'aluminium, solvant : éthanol-eau-méthyléthylcétone-acétylacétone 13 : 3 : 3 : 1 (v/v).

Révélation : pour a et b : solutions alcooliques de chlorure d'aluminium à 5 % (p/v), ou d'acétate basique de plomb à 5 % (p/v) ; pour c : solution méthanolique de diphenylborate d'amino-2 éthyle (0,10 g dans 15 ml méthanol).

Observation : lumière UV à 365 nm.

— *Spectrophotométrie UV et visible* : spectrophotomètre BECKMAN D. B. ; solution dans le méthanol pour spectrographie.

— *Hydrolyse acide* par l'acide sulfurique N, 2 h, au BM bouillant ; extraction de la génine par l'éther éthylique, puis par l'acétate d'éthyle (10 ml × 3 fois). Neutralisation de la liqueur aqueuse résiduelle par du carbonate de baryum, filtration, concentration à sec, reprise du résidu par 1 ml de pyridine.

3. — *Identification des génines :*

— C. C. M. a) de cellulose préétalée MERCK (0,25 mm), solvants : acide acétique-eau 50 : 50 (v/v), n-butanol-acide acétique-eau 4 : 1 : 5 : (v/v) ; b) de polyamide 11 F 254 nm sur feuilles d'aluminium, solvant : benzène-méthanol-méthyléthylcétone 100 : 50 : 50 (v/v).

Révélation et observation : comme pour les hétérosides.

— *Spectrophotométrie dans l'UV et le visible :* comme pour les hétérosides.

4. — *Identification des sucres :*

C. C. M. de silice préétalée MERCK (0,25 mm), solvant : n-butanol-isopropanol-eau 5 : 3 : 1 (v/v), 16 h. Révélation : phtalate d'aniline (6).

ANTHRAQUINONES.

1. — *Extraction et étude préliminaire :*

La poudre d'écorces de racines (155 g) est extraite en milieu neutre dans un appareil de Soxhlet successivement par l'éther de pétrole, le chloroforme et l'éther éthylique. Après concentration au demi sous pression réduite, seul l'extrait chloroformique fournit un précipité Pp (0,65 mg). Chacune des fractions est étudiée par C. C. M. de silice préétalée MERCK (0,25 mm), solvants : benzène-formiate d'éthyle 7 : 3 (v/v), benzène-méthanol 9 : 1 (v/v), benzène-formiate d'éthyle-acide formique 75 : 24 : 1 (v/v).

Révéléateur : potasse alcoolique à 5 %.

2. — *Isolement des anthraquinones des extraits éther de pétrole et chloroforme et d'autre part du précipité Pp.*

Chromatographie sur colonne de silice MERCK 70-230 mesh (25 × 2,5 cm) ; solvant : benzène progressivement enrichi de chloroforme. Les deux anthraquinones ainsi isolées (62 et 48 mg respectivement) et l'hétéroside anthraquinone (115 mg), séparé par l'éther éthylique, précipitent dans l'acétate d'éthyle additionné de quelques gouttes d'hexane.

3. — *Etude de la structure :*

— spectre UV : comme précédemment.

— spectre IR : en pastilles de KBr sur BECKMAN 40250.

— spectre de RMN : sur appareil VARIAN (T 60). Etalon interne T. M. S.

— spectre de masse : appareil VARIAN MAT 112.

— C. C. M. de silice préétalée MERCK (0,25 mm) après hydrolyse acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>N, 2 h, BM bouillant) de l'hétéroside. Solvant de la génine : benzène-formiate d'éthyle-acide formique 75 : 24 : 1 (v/v), chloroforme-méthanol-toluène 40 : 5 : 5 (v/v), toluène-acétone 95 : 5 (v/v). Révélation : solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à 5 %. Caractérisation des sucres : comme dans le cas des flavonoïdes.

## ACIDES PHÉNOLS.

### 1. — *Extraction* :

a) *Formes libres* : préparation d'infusé à 10 % avec des poudres de feuilles, d'écorces, de racines et de tiges (50 ml à chaque fois). Acidification à pH 1 par l'acide sulfurique au 1/2, extraction par l'éther éthylique (10 ml  $\times$  3 fois). L'extrait éthéré est traité par une solution aqueuse d'hydrogéné-carbonate de sodium à 2 % (10 ml  $\times$  3 fois). Cette solution alcaline est acidifiée à pH 1 par l'acide sulfurique au 1/2 et à nouveau extraite par l'éther (10 ml  $\times$  3 fois). Les solutions éthérées, lavées à l'eau, puis séchées sur sulfate de sodium anhydre, sont amenées à sec. Le résidu est repris par 2 ml d'éthanol.

b) *Formes combinées* : alcalinisation de l'infusé à 10 % (addition d'hydroxyde de sodium pour obtenir un titre de 2 M), saponification à 20 °C, 4 h, à l'obscurité. Puis acidification jusqu'à pH 1 et traitement comme précédemment.

### 2. — *Identification* :

Par C. C. M.  $\alpha$  de cellulose préétalée MERCK (0,25 mm), solvants : HCL 0,1 N ; acide acétique-eau 2 : 98 (v/v) et 15-85 (v/v) ;  $\beta$  de silice préétalée MERCK (0,25 mm), solvants : benzène-méthanol-acide acétique 90 : 15 : 5 (v/v) ; benzène-dioxanne-acide acétique 90 : 25 : 5 (v/v) (5). Révélation : pulvérisation de p-nitraline diazotée (p-nitraniline à 5 % dans l'acide chlorhydrique 2 N), puis de carbonate de sodium [solution aqueuse à 15 % (p/v)].

## COMPOSÉS STÉROÏDIQUES.

### 1. — *Extraction des stérols à partir de l'insaponifiable des écorces de tiges* :

Préparation de l'insaponifiable selon la méthode de la Pharmacopée française (VII<sup>e</sup> Ed., p. 1561) ; obtention d'une solution à 4 % dans le chloroforme et séparation par C. C. M. préparative (silice 0,5 mm) en présence d'un témoin de  $\beta$ -sitostérol, solvant : hexane-éther éthylique, 1 : 1 (v/v) et passage à l'étuve selon un protocole habituel de ce laboratoire [4]. Elution de la bande des stérols par l'éther éthylique, puis élimination du solvant.

### 2. — *Analyse chromatographique des stérols* :

Le résidu précédent dissous dans 2 ml de chloroforme est traité par C. P. G. après passage d'un mélange témoin (campestérol, stigmastérol,  $\beta$ -sitostérol, — 7-stigmasténols) [3].

## SUMMARY

Chemical investigations on *Danais fragrans* Gaertn (Rubiaceae) by R. André, F. Bailleul, P. Delaveau, R. R. Paris and H. Jacquemin (Paris).

Three flavonol glycosides were isolated from leaves and identified to kaempferol-3-O rhamnoglucoside, quercetol-3-O rhamnoglucoside and to a kaempferol-3-O rham



nodiglucoside. Root barks contain dihydroxy-1, 3 methyl-2 anthraquinone (rubiadine) in a free state and as a xyloglucoside and an hydroxy-1 dimethylantraquinone. Phenolic acids of the benzoic and cinnamic series are present in leaves, bark roots and stem roots. Campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol occur in stem roots and iridoïds in all studied organs.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLOOM (H.), BRIGGS (L. H.) et CLEVERLEY (B.). — *J. Chem. Soc.*, 1959, **1**, 178.
- [2] BREW (J. C.) et THOMSON (R. H.). — *J. Chem. Soc.*, 1971, **C**, 2001.
- [3] DELAVEAU (P.) et HOTELLIER (F.). — *Ann. pharm. fr.*, 1971, **29**, 7, 399.
- [4] DELAVEAU (P.). — *Prod. et Prob. pharm.*, 1973, **28**, 988.
- [5] HOTELLIER (F.) et DELAVEAU (P.). — *Ann. pharm. fr.*, 1972, **30**, 7, 495.
- [6] LE SCAO (F.), FAUGERAS (G.) et PARIS (R. R.). — *Pl. méd. et Phyto.*, 1975, **IX** : **1**, 32.
- [7] PARIS (R. R.) et NOTHIS (A.). — *Pl. méd. et Phyto.* 1969, **3**, 274.
- [8] PARIS (R. R.) et NOTHIS (A.). — *Pl. méd. et Phyto.* 1970, **1**, 63.
- [9] THOMSON (R. H.). — *Naturally Occuring Quinones*, 1971, Acad. Press Ed. London, New York.