

TANGUY (Josette)

RAPPORT DU STAGE EFFECTUE A L'UNIVERSITE DE LIVERPOOL

"HARTLEY BOTANICAL LABORATORIES" sous la direction du Dr. J. B. HARBORNE

J. TANGUY

AVRIL - MAI 1967

O. R. S. I. O. M. Fonds Documentaire

N° : 22592

Cpte : B

Au cours de ce stage, nous avons étudié l'absorption spectrale d'un grand nombre de composés phénoliques, puis les relations entre structure et vitesse de migration de ces substances, sur cellulose, dans différents solvants.

Ces méthodes ont été appliquées à la détermination des polyphénols dans nos extraits de *Nicotiana tabacum* variété Xanthi. Dans cette dernière partie nous nous sommes aidés de marqueurs donnés par le Dr J.B Harborne.

I. - ABSORPTION SPECTRALE EN ULTRA-VIOLET DES POLYPHENOLS.

Tous les phénols présentent une intense absorption dans l'ultra-violet. Il y a relation entre spectre et structure, il est donc fondamental de connaître les caractéristiques spectrales des différents groupes de substances phénoliques.

Les méthodes spectrales peuvent être utilisées, lors d'une étude quantitative et pour la caractérisation de composés inconnus.

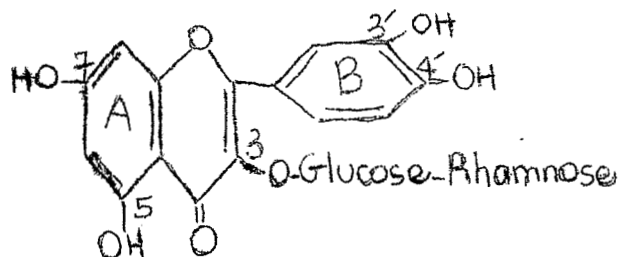
A. - ETUDE QUANTITATIVE.

Les mesures ont été faites sur un S.P automatique Unicam 800 pouvant recevoir quatre cellules.

Il y a proportionnalité entre absorption et concentration, il est ainsi possible de réaliser le dosage de la rutine en tenant compte de l'absorption des deux maximums à différentes concentrations.

Rappelons que la rutine est un glycoside renfermant de la quercétine ou 3, 5, 7, 3', 4' pentahydroxyflavone et du rutinose.

La formule développée est la suivante :



Le schéma I, représente les courbes d'absorption de la rutine à différentes concentrations. Les courbes de dosage sont données par les figures 2 et 3, elles donnent les variations de l'absorption en fonction de la concentration pour les deux bandes principales.

Des mesures directes d'absorption sur des extraits de plantes sont sujets à de nombreuses erreurs, il est donc nécessaire de purifier les polyphénols par chromatographie sur papier. L'absorption des substances peut être mesurée directement sur papier, mais il est préférable d'éluer les composés, en utilisant par exemple de l'éthanol 70 pour cent, et de mesurer ensuite leur absorption à la longueur d'onde appropriée. Préalablement, une courbe étalon est établie avec le marqueur choisi.

B. CARACTERISATION DE COMPOSES.

de

Chaque classe^v polyphénols possède des mouvements spectraux spécifiques. Le tableau I, donne les caractéristiques spectrales des différents groupes.

Les spectres des acides cinnamiques et des coumarines ne diffèrent pas énormément, cependant les acides cinnamiques existant sous forme d'isomères cis et trans, ont sur le pic principal à 310-330 m μ une épaule très prononcée.

Le schéma 4, représente les spectres en solution neutre de l'acide caféique et de l'esculétine.

Les relations entre spectre et structure ont ensuite été étudiées. Des mouvements bathochromiques, c'est-à-dire des déplacements des bandes vers le visible, ont été enregistrés dans les cas suivants :

1 . Hydroxylation.

Les fonctions hydroxyles sont auxochromes, et l'addition de tels groupements apporte à des noyaux aromatiques chromophores un mouvement bathochromique dans la position du maximum à la plus grande longueur d'onde.

Le tableau 2, permet d'apprécier l'effet de l'hydroxylation sur le maximum dans la série des flavones. L'addition d'un hydroxyle dans le noyau A provoque un effet bathochromique beaucoup moins prononcé que la substitution dans le noyau B.

2 . Unsaturation.

L'introduction d'une double liaison dans l'acide dihydro-caféique (λ max 280m μ), donne l'acide caféique (λ max 324m μ). Cela correspond à un mouvement bathochromique de 44m μ . Une addition similaire au flavanone (λ max 250m μ) donne naissance au flavone (λ max 297m μ). Le mouvement produit est alors de 47m μ .

3 . Autres groupements auxochromes.

Les fonctions carbonyles, carboxyles et aminées produisent un mouvement bathochromique dans la position de la bande absorbant à la plus grande longueur d'onde. Là encore, la position de la substitution est importante, il est à noter que l'addition d'un carboxyle en position para cause un mouve-

ment hypsochromique.

Si nous résumons voici dans l'ordre de décroissance les fonctions présentant un mouvement bathochromique.



Des mouvements hypsochromiques, c'est-à-dire un déplacement des bandes vers le lointain ultra-violet, sont notés dans plusieurs cas.

1 . Méthylation.

La méthylation de simples phénols ne provoque qu'un léger mouvement hypsochromique sur le spectre, mais l'effet est très prononcé pour les substances très hydroxylées. Le tableau 3, permet de voir l'influence de la méthylation sur le spectre des phénols.

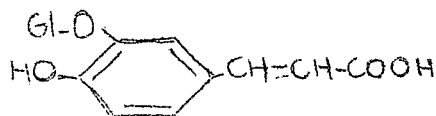
La méthylation en 7 de la quercétine n'a pas un effet déterminant sur le spectre, mais la méthylation en 5 en supprimant la liaison hydrogène entre l'hydroxyle en 5 et le groupement carbonyle produit un mouvement ~~bathochromique~~ ^{hypso-}chromique important.

2 . Glycosylation.

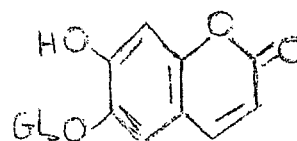
Le mouvement hypsochromique provoqué par la glycosylation est similaire à celui produit par la méthylation.

Le tableau 4, montre l'effet de la glycosylation sur le spectre.

La glucosylation du caféique en position 3, cause un important déplacement ($\Delta\lambda -13\text{m}\mu$), tandis que la glucosylation en 4 a peu d'effet. Le même mouvement hypsochromique intervient pour les glycosides de la 6-7 dihydroxycoumarine ou esculétine. Le 6 glucoside ou esculine a un maximum de $338\text{m}\mu$, alors que le 7 glucoside a son maximum à $345\text{m}\mu$. ($\Delta\lambda -6\text{m}\mu$).



Caféique-3-glucoside



Esculine

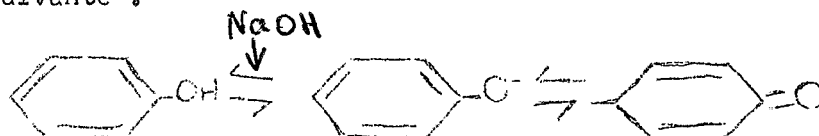
Il est à remarquer que la substitution du rhamnose à l'hydroxyle en position 3 des flavonols détermine un plus large mouvement hypsochromique que l'addition du glucose.

3 . Acétylation.

L'acétylation de fonction hydroxylée provoque un mouvement hypsochromique sur le spectre en ultra-violet. L'effet de l'acétylation est d'abolir le caractère auxochromique des groupements phénoliques.

Les spectres de ces différentes substances ont été établis en solution neutre et en présence d'un certain nombre d'ions inorganiques (chlorure d'aluminium, acétate de sodium, soude, acétate de sodium, acide borique). Les solvants utilisés ont été de l'éthanol et de l'eau.

Les sels sont d'une aide précieuse pour les déterminations de structure. De larges mouvements bathochromiques sont enregistrés en solution alcaline avec tous les phénols. On reconnaît la nature phénolique d'un composé en observant le déplacement vers le visible qui intervient quand on passe d'une solution neutre à une solution alcaline. En solution alcaline il y a ionisation de la façon suivante :

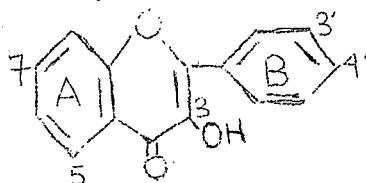


Le déplacement vers le visible est dû à l'ion phénoxyde.

L'ionisation des acides aromatiques cause un mouvement hypsochromique dans le spectre (acide cinnamique λ_{max} et OH 273m μ ; λ_{max} alcali 267m μ), de telle sorte que les phénols ayant un groupement carboxylique libre ne donne pas d'aussi larges mouvements bathochromiques que les esters correspondants. Ce fait est utile pour distinguer les acides phénoliques et les acides cinnamiques de leurs esters.

L'usage de réactifs tels que le chlorure d'aluminium, l'acétate de sodium, l'acide borique en produisant des mouvements dans les maximums permet de localiser un certain nombre de fonctions et donc d'avoir une idée sur la structure.

Prenons comme exemple un flavonol dont la structure est la suivante :



Les glycosides et les aglycones donnent avec le chlorure d'aluminium un déplacement vers le visible, si, ils possèdent un hydroxyle libre en 3 ou en 5.

L'acétate de sodium produit un mouvement bathochromique net quand le composé possède un hydroxyle en 7. Si le noyau B est du type catéchol la bande principale subit un mouvement bathochromique. Dans ce dernier cas le déplacement ne se vérifie que pour les substances du type quercétine et myricétine.

En solution alcaline, les glycosides des flavonols décomposent si ils possèdent des hydroxyles libres en 3' et 4'. Dans les solutions neutres les flavonosides ayant un sucre en position 3 se reconnaissent aisément car il y a un effet hypsochromique très prononcé sur le spectre.

X. Avec l'acétate de sodium + acide borique.

II. - INFLUENCE DE LA STRUCTURE SUR LES VITESSES DE MIGRATION OU R_f .

Prenons comme exemple un flavonol dont la structure est donnée dans le chapitre précédent. Plus il y a de sucres en position 3, plus le R_f est bas dans un solvant alcoolique comme le butanol acétique, et plus il est élevé dans un solvant aqueux. Les 3-7 glycosides se comportent en général comme les 3 glycosides mais migrent plus vite dans l'eau, les 7, 3' ou 4' possédant des structures planes sont peu mobiles dans un solvant aqueux.

Le diagramme 5 montre la répartition de ces substances dans un solvant alcoolique et aqueux. Le tableau 5 donne les R_f de ces composés dans le butanol acétique et l'acide acétique 5 pour cent aqueux.

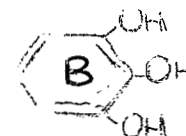
L'identification des différents flavonosides entre eux peut se faire en ultra-violet en utilisant comme réactif le chlorure d'aluminium et les vapeurs d'ammoniaque. Les dérivés du kaempférol apparaissent verts fluorescents, ceux de la quercétine jaunes, et les dérivés de la myricétine bruns.



Kaempférol



quercétine



myricétine

III. - APPLICATION DES DIFFERENTES TECHNIQUES A LA DETERMINATION DES PHENOLS

DE NICOTIANA TABACUM variété XANTHI.

Les phénols du tabac ont été séparés par chromatographie sur papier en utilisant comme solvants le butanol acétique et l'acide acétique 5%.

L'identification a été faite en utilisant les méthodes spectrales, les hydrolyses suivies de la détermination de l'aglycone et des résidus non phénoliques.

Des marqueurs ont été également utilisés.

Le tableau 6 donne les R_f des principaux polyphénols du tabac dans les deux solvants, ainsi que les maximums des principaux pics. Le schéma 6 représente un chromatogramme d'un extrait total. Les réactifs utilisés ont été le chlorure d'aluminium, le carbonate de sodium, et la soude. Les ~~échantillons~~ ^{échantillons ont hydrolyses} ont été faites avec HCl 2N pendant 30 minutes au bain-marie bouillant. L'acidité a été enlevée avec de la di-n-octylméthylamine dans du chloroforme. La détection des sucres a été faite avec du phtalate d'aniline hydrogéné.

Les composés F₁ et F₃ donne un net mouvement bathochromique avec l'acétate de sodium acide borique, tandis qu'il n'y a aucun déplacement de spectre avec le composé F₂. Le tableau 7 représente les aglycones et les résidus non phénoliques détectés après hydrolyse puis élution des spots. Le tableau 8 donne les structures des principales substances détectées dans *Nicotiana tabacum* variété Xanthi.

TABLEAU 1 . - Caractéristiques spectrales des différents groupes de phénols.


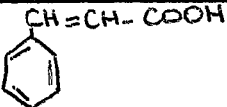
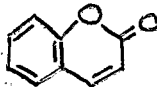
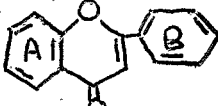
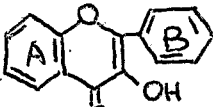
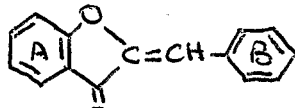
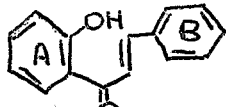

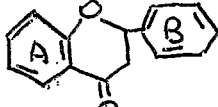
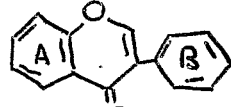
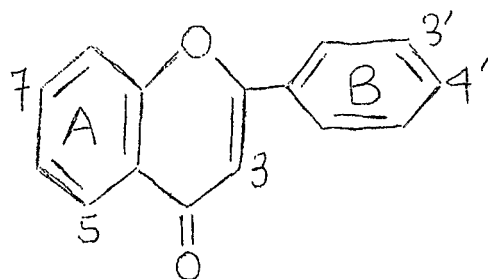
Classes	Principaux maximums $m\mu$	Formules
phénols	265 - 275	
acides cinnamiques	230 - 240 290 - 330	
coumarines	220 - 230 310 - 350	
flavones	250 - 270 330 - 350	
flavonoïds	250 - 270 350 - 390	
aurones	390 - 430	
chalcones	365 - 390	
anthocyanes	475 - 560	
flavanones	225 275 - 290	
isoflavones	255 - 265	
xanthones	230 - 245 250 - 265	

TABLEAU 2 . - Effet de l'hydroxylation sur le maximum dans la série des flavones.



flavones	λ max (m μ)	$\Delta \lambda$ (m μ)
flavone	297	-
3' -hydroxy	297	0
4' -hydroxy	327	30
3' -4' -hydroxy	343	46
7' -hydroxy	308	11
5 -hydroxy	337	40
3 -hydroxy	344	47

TABLEAU 3 . - Effet de la méthylation sur le spectre d'un certain nombre de phénols.

Composés	λ max (m μ)	$\Delta \lambda$ m μ
simples phénols		
phénol	273	-
anisole	272	- 1
acides cinnamiques et ses dérivés		
4-hydroxy	310	-
4-methoxy	307	- 3
3-4 dihydroxy	324	-
3-4 dihydroxy -5 methoxy	325	-
3-5 dimethoxy -4 hydroxy	330	-
3-4-5 trimethoxy	307	- 23
quercétine et ses dérivés		
quercétine	375	-
3'-methyl ether	369	- 6
7 -methyl ether	374	- 1
5 -methyl ether	364	- 11
3 -methyl ether	360	- 15

TABLEAU 4 . - Effet de la glycosylation sur le spectre des composés
phénoliques.

Composés	Δ max (m μ)	Δ λ (m μ)
dérivés des acides cinnamiques		
caféique	324	-
caféique-3-glucoside	311	-13
caféique-4-glucoside	322	-2
caféique-glucose-ester	334	+10
glycosides de la quercétine		
quercétine	375	-
quercétine-7-glucoside	374	-1
quercétine-3'-glucoside	367	-8
quercétine-4'-glucoside	366	-9
quercétine-3-7-diglucoside	363	-12
quercétine-3-glucoside	360	-15
quercétine-3-4'-diglucoside	350	-25
flavonols 3 rhamnosides et 3 glucosides		
kaempférol-3-glucoside	352	-
kaempférol-3-rhamnoside	344	-8
quercétine-3-glucoside	360	-
quercétine-3-rhamnoside	350	-10
myricétine-3-glucoside	366	-
myricétine-3-rhamnoside	353	-13

TABLEAU 5 . - R_f des composés phénoliques dans le butanol acétique et l'acide acétique 5% aqueux.

Composés	R _f X100	
	butanol acétique	acide acétique 5%
dérivés du kaempférol		
kaempférol	83	0
kaempférol-3-rhamnoside	78	49
kaempférol-3-glucoside	70	43
kaempférol-3-rutinoside	54	54
kaempférol-3-rhamnodiglucoside	41	61
kaempférol-7-glucoside	54	17
kaempférol-7-rhamnoside	75	18
kaempférol-3-rutinoside-7-glucoside	15	65
dérivés de la quercétine		
quercétine	64	0
quercétine-3-rhamnoside	72	49
quercétine-3-glucoside	58	37
quercétine-3-rutinoside	45	51
quercétine-3-rhamnodiglucoside	36	54
quercétine-7-glucoside	36	10
quercétine-3-rutinoside-7-glucoside	10	55

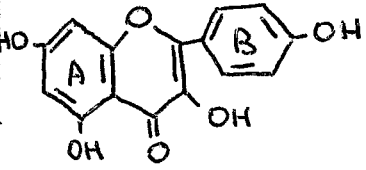
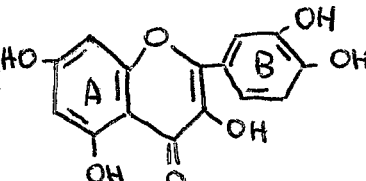
TABLEAU 6 . - R_f des composés phénoliques de *Nicotiana tabacum* variété Xanthi dans le butanol acétique et l'acide acétique 5% aqueux.

Composés	R _f X100		pics principaux (mμ)
	butanol acétique	acide acétique 5%	
A	45	65 , 74	245 , 325
B	50	54 , 70	245 , 327
C	57	61 , 75	245 , 327
D	72	70 , 84	
F ₁	41	36	258 , 360
F ₂	50	40	267 , 353
F ₃	53	17	240 , 255
F ₄	29	60	
F ₅	18	54	
chlorogénique	50	54 , 70	245 , 327
néochlorogénique	45	65 , 74	245 , 327
rutine (quercétine-3-rutinoside)	41	36	258 , 360
nicotiflorine (kaempférol-3-rutinoside)	50	40	267 , 353
isoquercitrine (quercétine-3-glucoside)	53	17	240 , 255

TABLEAU 7 . - Les aglycones et les résidus non phénoliques détectés après élution et hydrolyses des principaux spots dans *Nicotiana tabacum* variété Xanthi.

	types de l'hydrolyse	aglycones	résidus non phénoliques
F ₁	acide	quercétine	glucose, rhamnose
F ₂	acide	kaempférol	glucose, rhamnose
F ₃	acide	quercétine	glucose
F ₄	acide	kaempférol	glucose, rhamnose
F ₅	acide	quercétine	glucose, rhamnose
A	alcaline	caféique	acide quinique
B	alcaline	caféique	acide quinique
C	alcaline	caféique	acide quinique
D	alcaline	para-coumarique	?

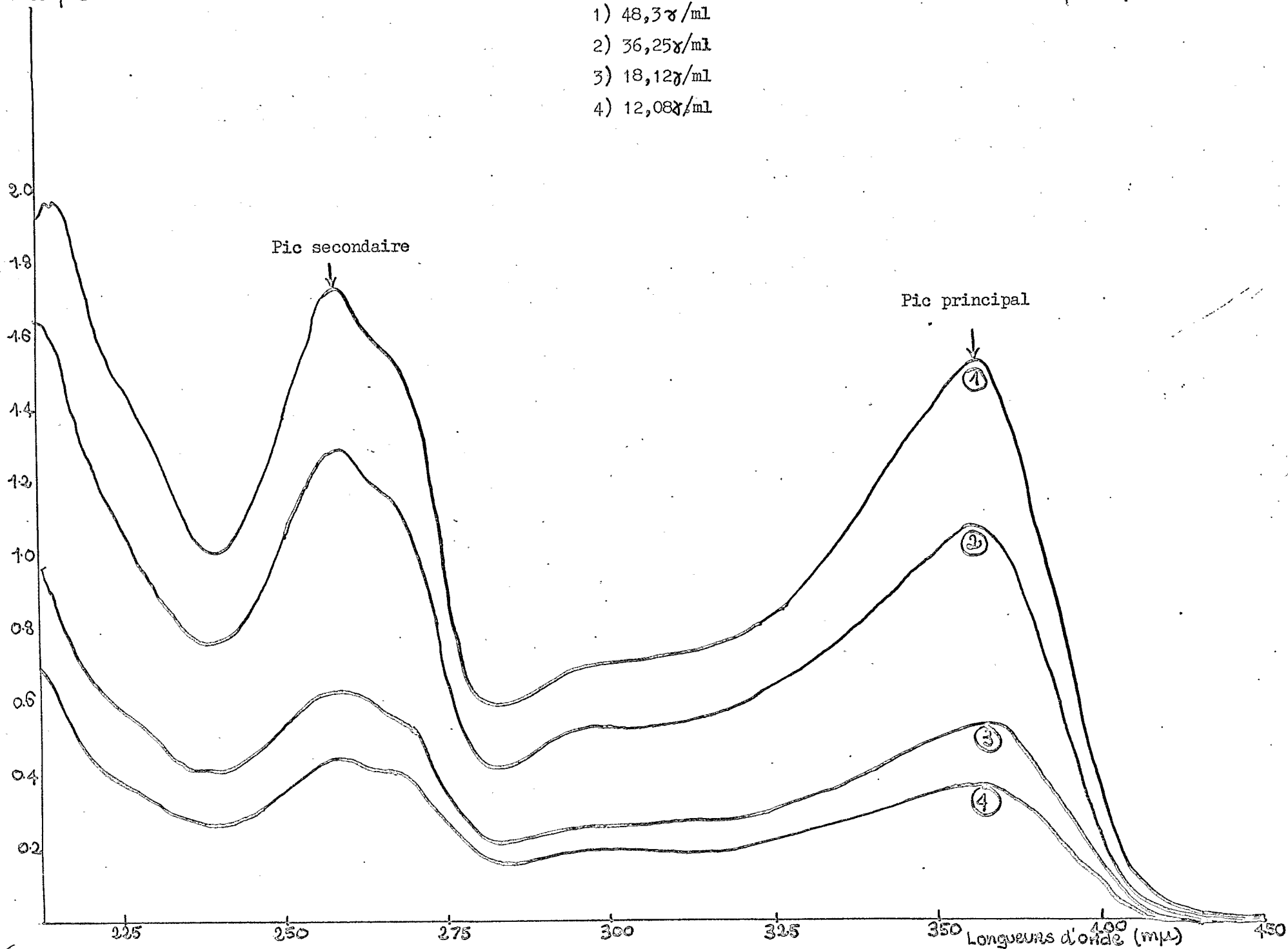
TABLEAU 8 . - Les principales substances phénoliques détectées dans *Nicotiana tabacum* variété Xanthi.

groupes	extrait hydrolysé	extrait non hydrolysé
<p>Acides cinnamiques</p>	<div style="text-align: center;"> <chem>OC(=O)C=Cc1ccc(O)c(O)c1</chem> acide caféique </div> <div style="text-align: center;"> <chem>OC(=O)C=Cc1ccc(O)cc1</chem> acide para-coumarique </div>	<p>acide chlorogénique ou 3-O-caféoylquinique</p> <p>acide néochlorogénique ou 5-O-caféoylquinique</p> <p>probablement le 4-O-caféoylquinique</p> <p>ester du para-coumarique</p>
<p>glycosides de flavonols</p>	<div style="text-align: center;">  kaempférol </div> <div style="text-align: center;">  quercétine </div>	<p>rutine ou quercétine-3-rutinosé</p> <p>nicotiflorine ou kaempférol-3-rutinosé</p> <p>isoquercitrine ou quercétine-3-glucose</p> <p>quercétine-3-rutinosé-7-glucose kaempférol-3-rutinosé-7-glucose</p>

Absorption.

Schéma 1- Courbes d'absorption de la rutine à différentes concentrations.

- 1) 48,3 γ /ml
- 2) 36,25 γ /ml
- 3) 18,12 γ /ml
- 4) 12,08 γ /ml



concentration
 γ/ml

Schéma 2- Variations de l'absorption en fonction de la concentration pour le pic principal.

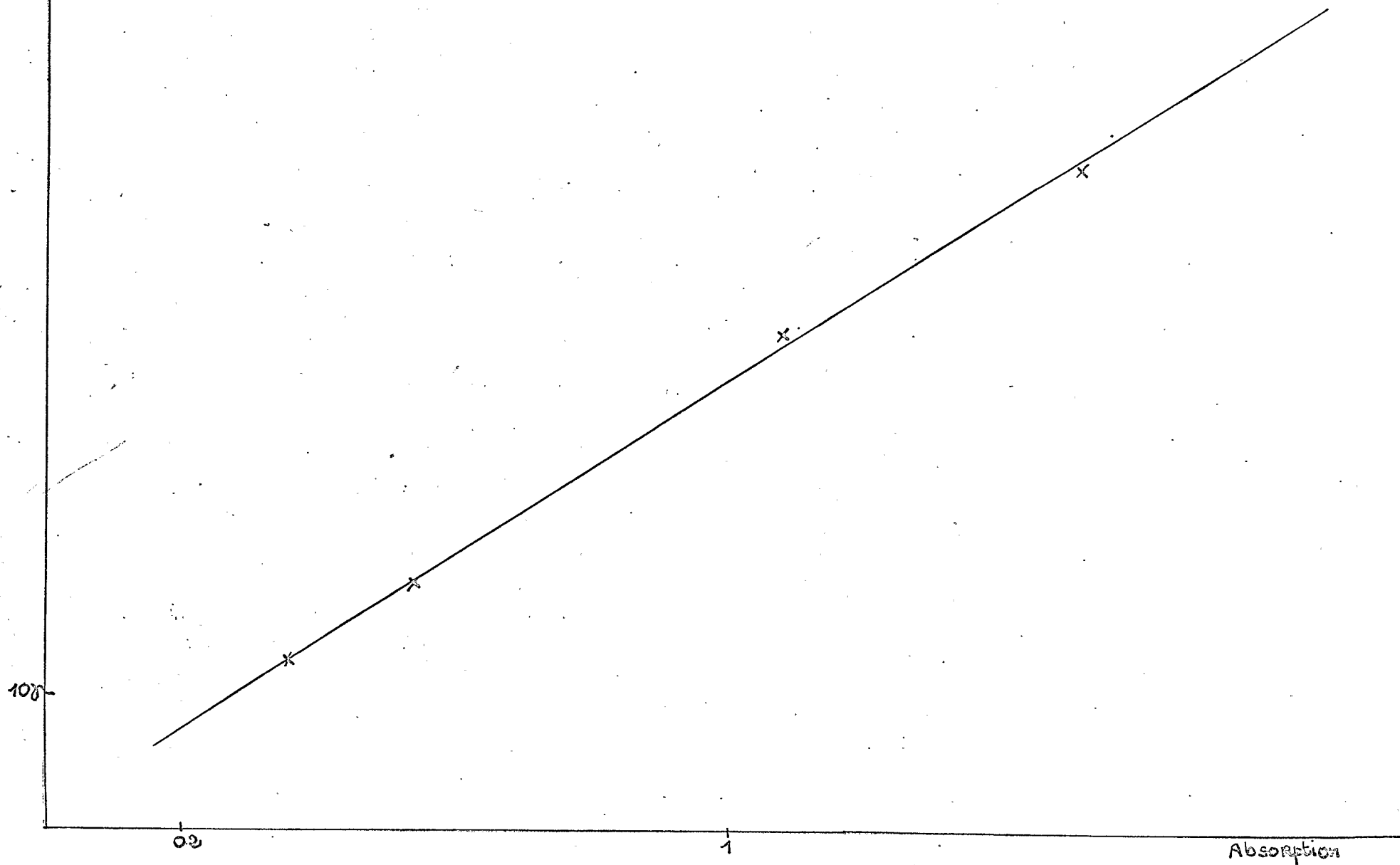
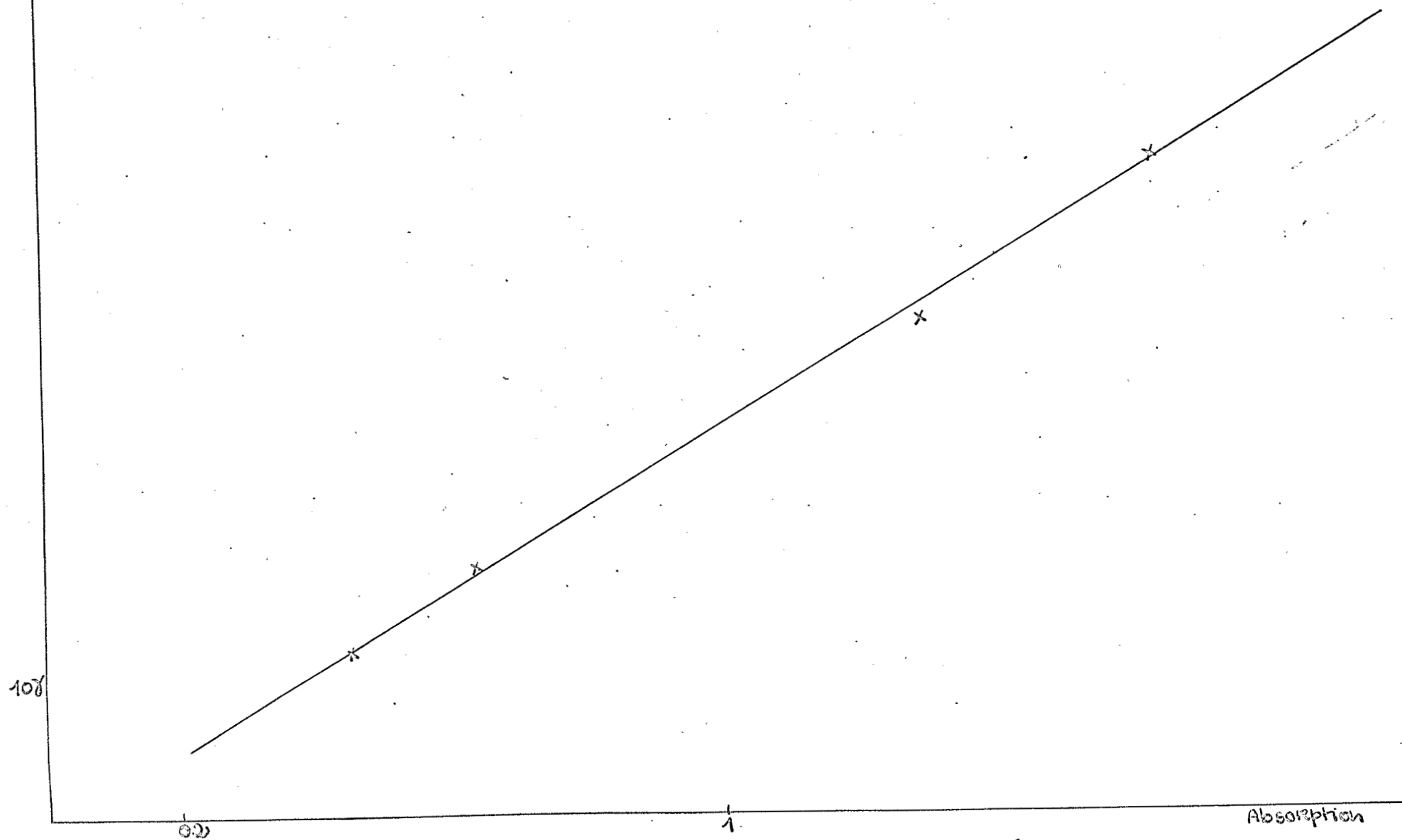


Schéma 3- Variations de l'absorption en fonction de la concentration
pour le pic secondaire.

concentration
g/ml



Absorption

Schéma 4- Spectres en solution neutre de l'acide caféique et le l'esculétine.

1) Acide caféique

2) Esculétine

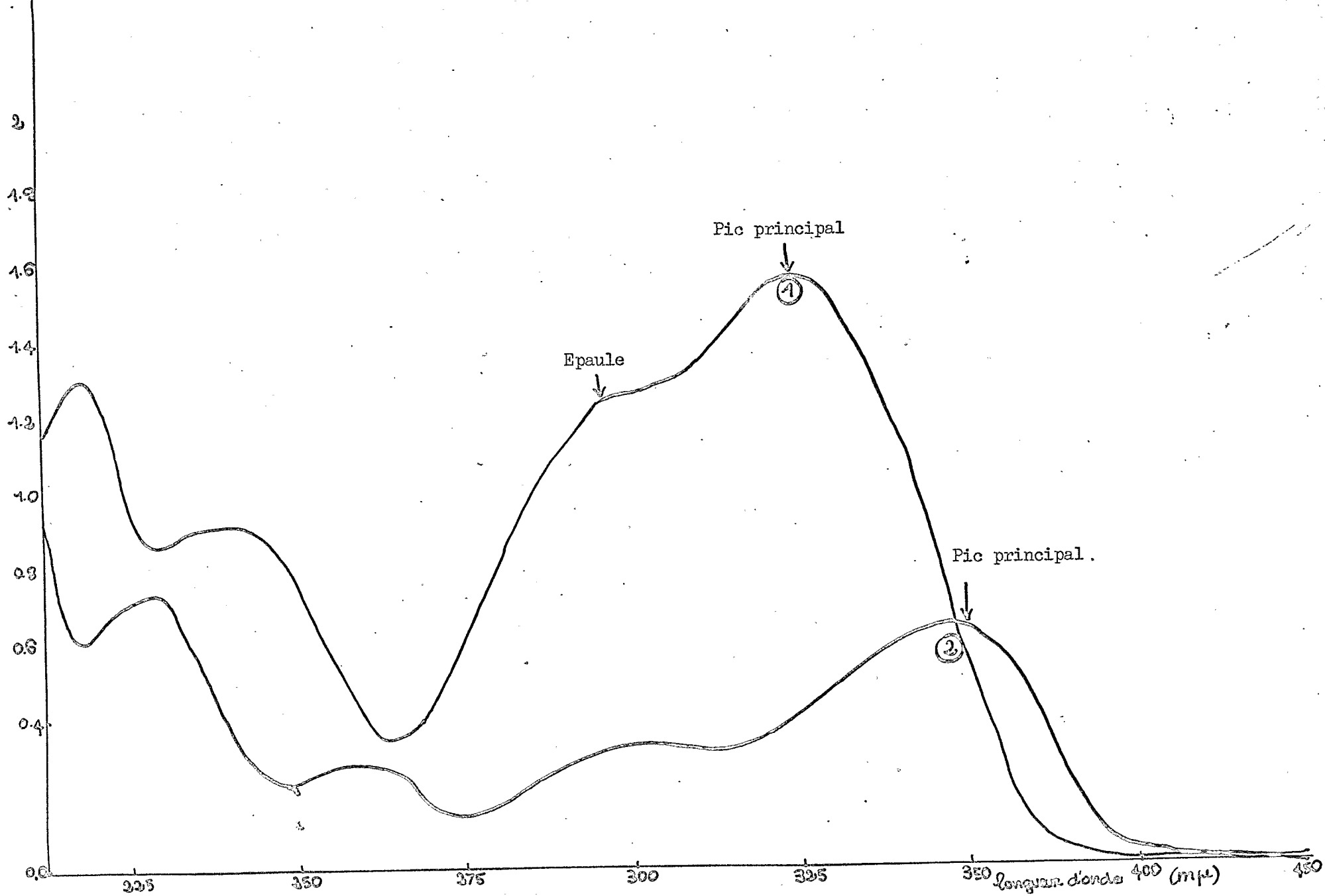
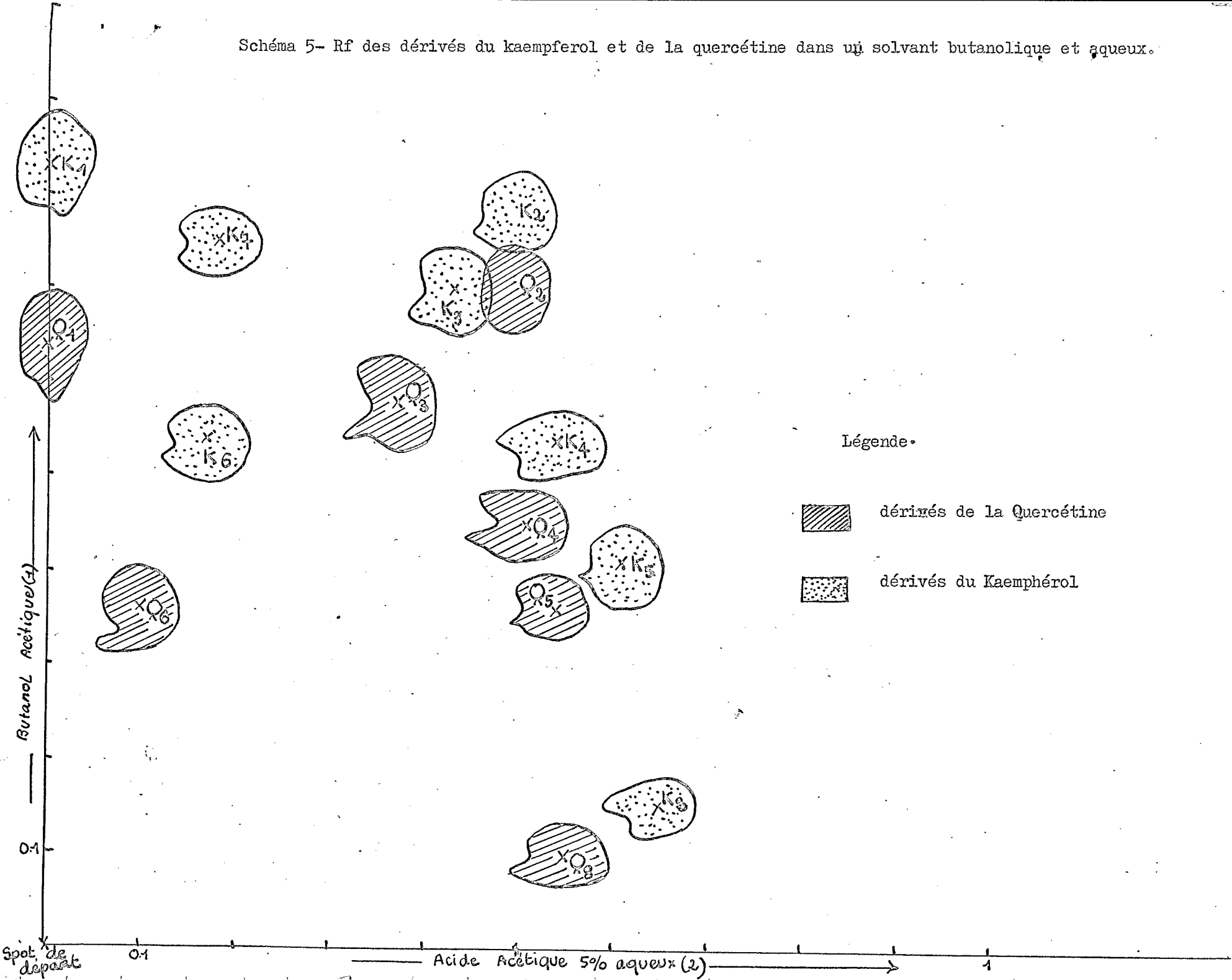


Schéma 5- Rf des dérivés du kaempferol et de la quercétine dans un solvant butanolique et aqueux.



LEGENDE DU SCHEMA 5

Dérivés du kaempférol

K₁ = kaempférol

K₂ = kaempférol-3-rhamnose ou afzeline

K₃ = kaempférol-3-glucose ou astragaline

K₄ = kaempférol-3-rutinose ou nicotiflorine

K₅ = kaempférol-3-rhamnodiglucoe

K₆ = kaempférol-7-glucose

K₇ = kaempférol-7-rhamnose

K₈ = kaempférol-3-rutinose-7-glucose

Dérivés de la quercétine

Q₁ = quercétine

Q₂ = quercétine-3-rhamnose ou quercitrine

Q₃ = quercétine-3-glucose ou isoquercitrine

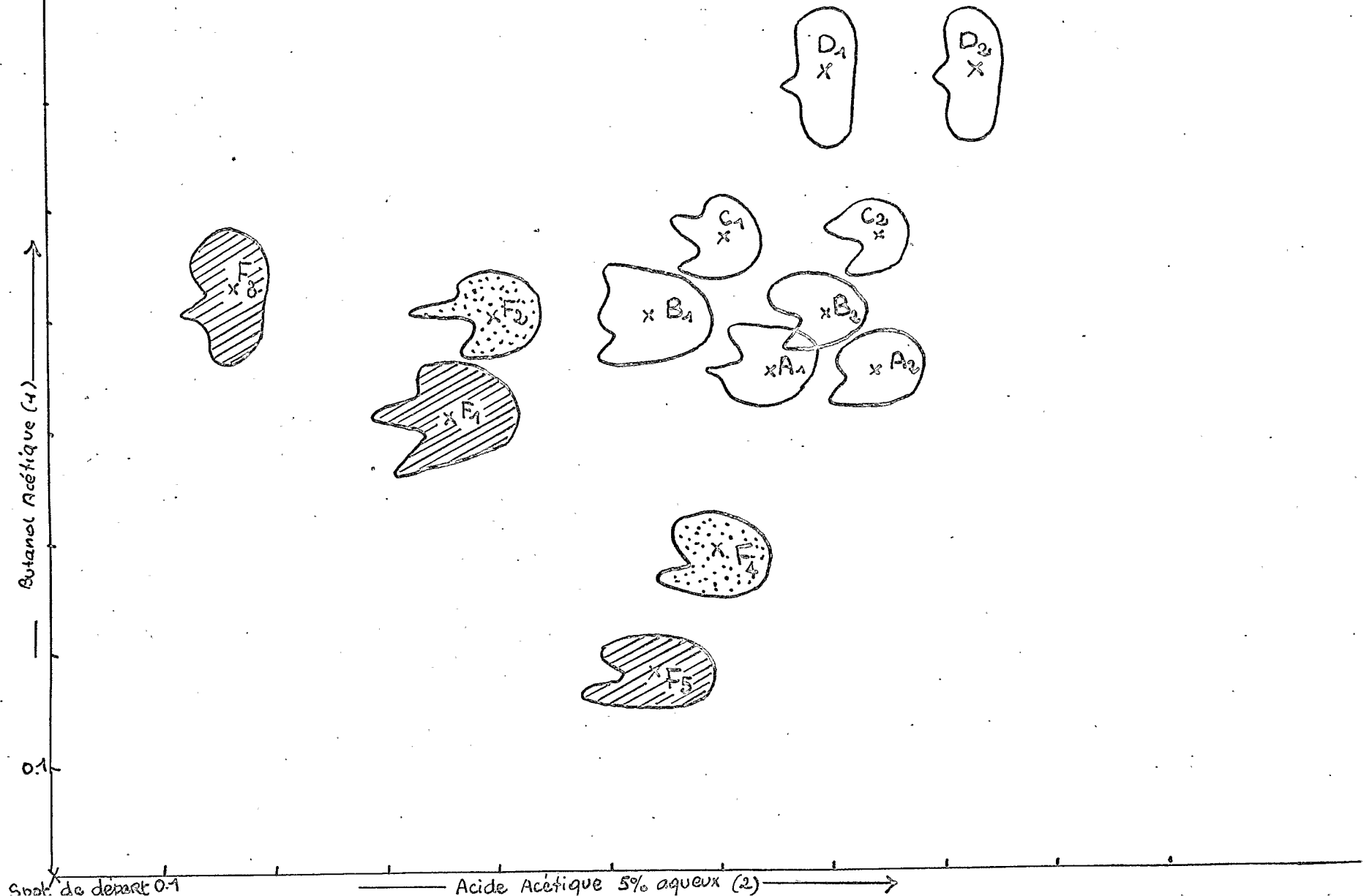
Q₄ = quercétine-3-rutinose ou rutine

Q₅ = quercétine-3-rhamnodiglucose

Q₆ = quercétine-7-glucose ou querciméritrine

Q₇ = quercétine-3-rutinose-7-glucose

Schéma 6- Schéma d'un chromatogramme d'un extrait total de *Nicotiana tabacum* variété Xanthi.



LEGENDE DU SCHEMA 6

Flavonosides

- F₁ = quercétine-3-rutinosé ou rutine
- F₂ = kaempférol-3-rutinosé ou nicotiflorine
- F₃ = quercétine-3-glucose ou isoquercitrine
- F₄ = kaempférol-3-rutinosé-7-glucose
- F₅ = quercétine-3-rutinosé-7-glucose

Dérivés des acides cinnamiques

- A = acide néochlorogénique ou 5-O-caféoylquinique, isomérisation en deux isomères trans et cis dans solvant aqueux (A₁ et A₂).
- B = acide chlorogénique ou 3-O-caféoylquinique
- C = isomère du chlorogénique probablement le 4-O-caféoylquinique
- D = ester du para-coumarique