

LES HÉTÉROSIDES ANTHRONIQUES DE *CASSIA ANGUSTIFOLIA* PENDANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE*

JOSEPH LEMLI et JOËL CUVEELE

Laboratorium voor Farmacognosie, Katholieke Universiteit te Leuven, Van Evenstraat 4, 3000 Leuven, Belgium

(Reçu le 4 juin 1974)

Key Word Index—*Cassia angustifolia*; Leguminosae; senna; anthrone glycosides; variation in seedlings.

Abstract—The different anthrone glycosides are determined in the organs of the seedlings and in the roots and leaves of adult plants of *Cassia angustifolia* (senna). New diglucosides are described. Dianthrone is only present in very small quantities in the living plant.

Résumé—Les différents hétérosides à génine anthrone sont déterminés dans les organes de la plantule ainsi que dans les feuilles et racines des plantes adultes de *Cassia angustifolia* (senna). De nouveaux diglucosides ont été mis en évidence. Les formes dianthrone sont seulement présentes en très faibles quantités dans la plante vivante.

INTRODUCTION

Jusqu' à présent les hétérosides anthroniques de *Cassia angustifolia* (séné) n' ont jamais été étudiés pendant le développement de la plante. Seulement deux travaux sur les dérivés anthraquinoniques ont été publiés [1,2]. Des dosages globaux de ces dérivés ont été effectués et ont montré que le pourcentage des anthraquinones augmente dans les feuilles jusqu' au moment de la floraison et que dans les fruits les anthraquinones de type rhéine sont prédominants, leur teneur diminuant en cours de maturation. Dans les plantules le chrysophanol et l' aloé-émodyne sont formés d' abord, suivis par la rhéine. Friedrich et Baier [3] ont en outre démontré la présence de physcion et une faible quantité d' émodyne dans les cotylédons. Des données quantitatives font entièrement défaut et les auteurs ont mis en évidence seulement les dérivés oxydés après hydrolyse des hétérosides. La forme sous laquelle ces substances se trouvent dans la plante n' est pas déterminée et les analyses ont été effectuées sur du matériel séché. La

présence d' aloé-émodyne anthrone et rhéine anthrone sous forme libre ou combinée fut cependant constatée dans les feuilles de *Cassia acutifolia* [4], mais sans aucune indication quantitative. En vue de pouvoir déterminer quantitativement les hétérosides à génine anthrone nous avons élaboré une méthode de densitométrie directe de leurs dérivés avec le nitrosodiméthylaniline. La chromatographie de ces dérivés a été décrite [4,5]. La méthode rend possible le dosage individuel des différents hétérosides tels qu' ils sont présents dans la plante vivante.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La chromatographie des dérivés des hétérosides à génine anthronique avec le nitrosodiméthylaniline a révélé l' existence de sept mono- et di-glucosides dans toutes les parties de la plante. Dans le Tableau 1 sont données les valeurs R_f de ces hétérosides et leur composition.

Il est à noter que les monoglucosides de chrysophanol et de physcion ont les mêmes valeurs R_f que le monoglucoside d' émodyne anthrone. Toutefois, nous n' avons jamais constaté la présence de

* Communication 24 des Recherches sur les drogues à principes anthraquinoniques.

Tableau 1. R_f et composition des hétérosides anthroniques de *Cassia angustifolia*

Hétéroside	R_f	Abréviation
Emodine anthrone monoglucoside	0,50	E mgl
Aloe-émordine anthrone monoglucoside	0,43	A mgl
Rhéine anthrone monoglucoside	0,30	R mgl
Chrysophanol anthrone diglucoside	0,23	C dgl
Physcion anthrone diglucoside	0,23	P dgl
Aloe-émordine anthrone diglucoside	0,17	A dgl
Rhéine anthrone diglucoside	0,10	R dgl

Les hétérosides sont sous forme de leur dérivés de nitrosodiméthylaniline (voir partie expérimentale). Les anthrones libres et l'excès du réactif se trouvent dans la partie supérieure du chromatogramme ($R_f > 0,5$).

ces monoglucosides. Dans les résultats nous avons toujours combiné les teneurs en diglucosides de chrysophanol et de physcion puisque ces deux glucosides ont également la même valeur R_f . Ils s'y trouvent généralement dans la proportion 1:1.

Sauf pour l'aloë-émordine anthrone et la rhéine anthrone dont la présence sous forme combinée a été signalée [4,6], tous ces hétérosides sont mis en évidence pour la première fois dans la plante vivante. En vue de la détermination de leur structure toutes les taches des chromatogrammes furent isolées par élution et la nature de la génine fut déterminée après hydrolyse oxydative par comparaison avec des génines témoins. L'hydrolyse des mono- et di-glucosides fournit seulement le glucose. Pour les diglucosides il fut démontré que les deux glucoses sont attachés au même hydroxyle. En effet l'hydrolyse de ces hétérosides par l'acide sulfurique dilué fournissait le bioside gentiobiose. Il ne fut pas prouvé si le bioside est attaché à l'hydroxyle en position 1 ou 8.

Le dosage quantitatif de tous ces hétérosides fut effectué par densitométrie des taches obtenues après chromatographie d'un extrait à partir des différents organes frais de la plante vivante. En ajoutant le réactif au liquide extractif (la pyridine)

les dérivés des hétérosides anthroniques sont formés pendant l'extraction même et aucune détérioration ne fut constatée.

La plantule

La semence est exempte de dérivés anthracéniques [1] et la synthèse de ces dérivés ne commence que quand la racine s'est formée. Le Tableau 2 montre le développement des hétérosides dans les cotylédons. Dans le premier stade les cotylédons sont encore enfermés dans la graine mais une racine s'est déjà formée (± 3 cm). A partir du second stade (< 1 jour) les cotylédons sont complètement sortis de la graine et ont une longueur de 8 mm. Après 21 jours ils mesurent 12 mm. Entre-temps leur poids a doublé (de 11 à 24 mg).

On est tout de suite frappé par l'absence de monoglucosides dans les cotylédons quand ils sont encore enfermés dans la graine et par la transformation rapide des diglucosides en monoglucosides. En effet, dès l'éclosion des cotylédons la teneur relative en diglucosides tombe en 1 jour de 99 à 16%. Après 3 semaines le pourcentage de diglucosides ne représente plus que 5% du total.

En ce qui concerne la génine on constate qu'il se forme en premier lieu le chrysophanol anthrone

Tableau 2. Analyse des cotylédons

Stade de développement et poids moyen (mg)	Quantité des Hétérosides* ($\mu\text{g}/100$ mg et % rel entre crochets)					
	E mgl	A mgl	R mgl	C dgl + P dgl	A dgl	R dgl
Cotylédons dans la graine, racine présente (6,95)		($< 0,5$)	($< 0,5$)	505(87)	42(7)	32(5,5)
< 1 jour (11,7)	154(5,5)	1330(49)	782(29)	207(8)	69(2,5)	165(6)
1 jour (14,4)	53(3)	858(47)	782(43)	68(4)	26(1,5)	26(1,5)
3 jours (14,5)	36(2)	724(46)	714(45)	62(4)	31(2)	16(1)
8 jours (17,5)	27(1,7)	686(43)	814(52)	32(2)	24(1,5)	5,4(0,3)
21 jours (24,1)	23(2)	490(40)	643(53)	23(2)	31(2,5)	5(0,5)

* Pour les abréviations voir Tableau 1.

† Les analyses ont été effectuées sur 5-8 cotylédons.

Tableau 3. Analyse des tiges

Stade de développement	Quantité des Hétérosides* ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ et $\%$ rel)			
	R mgl	C dgl + P dgl	A dgl	R dgl
Hypocotyle				
< 1 jour	8,5(12)	61(86)	1,3(2)	—(—)
1 jour	11,6(18)	51(80)	traces	1,4(2)
3 jours	24,5(33)	40(52)	6,3(8)	6(7)
8 jours	27(44)	26(43)	6(9)	2(4)
21 jours	24(50)	19(39)	4(8)	1,5(3)
Plante adulte	184(97)	1(0,5)	1(0,5)	3(2)

* Voir Tableau 1.: les analyses ont été effectuées avec les organes de 5 plantes.

sous forme de diglucoside à côté de faibles quantités des diglucosides d' aloé-émodyne et de rhéine. Ceci fut constaté par Fairbairn et Shrestha [1]. Cependant après 24 heures on assiste déjà à une intense synthèse d' aloé-émodyne ($156 \mu\text{g}$ par cotylédon) sous forme de monoglucoside. Cette génine n' augmente plus après le premier jour et on voit sa transformation progressive en rhéine. En 3 semaines la quantité totale d' aloé-émodyne (Amgl + Adgl) diminue de 164 à $126 \mu\text{g}$ par cotylédon tandis que la rhéine augmente de 112 à $157 \mu\text{g}$. Entretemps on voit également la diminution constante de l' émodyne.

L' hypocotyle se développe pendant ce même temps de 35 mm à 90 mm. Le Tableau 3 montre les variations des teneurs en mono- et di-glucosides dans cet organe. Il est remarquable de constater que les monoglucosides de l' émodyne et de l' aloé-émodyne y font complètement défaut comme dans les cotylédons encore enserrés dans la graine. Les diglucosides de chrysophanol et de physcion y sont

les produits principaux, qui diminuent régulièrement dès le premier jour, tandis que le monoglucoside de rhéine augmente.

Dans la racine (Tableau 4) on constate également dès sa formation, une très grande quantité des diglucosides de chrysophanol et de physcion. Cette quantité diminue rapidement en tombant à la moitié de sa valeur initiale à l' apparition des deux cotylédons (< 1 jour). Parallèlement il y a formation de chrysophanol anthrone libre. C' est le seul organe où nous avons observé la formation des formes libres.

Plantes adultes

Le Tableau 5 donne un aperçu des résultats d' analyse de plantes de 5 mois ayant 15 étages de feuilles. Les folioles des bourgeons, ainsi que celles de la 3ième et 6ième insertion d' en haut ont été analysées, de même que les tiges et la racine. On constate que seulement les monoglucosides de rhéine anthrone et d' aloé-émodyne anthrone sont

Tableau 4. Analyse des racines

Stade de développement	Quantité des Hétérosides* ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$)			
	C dgl + P dgl	A dgl	R dgl	Chrysophanol Anthrone libre
Plantule				
Cotylédons dans la graine	138	11	11	traces
< 1 jour	72	—	—	53
1 jour	17	—	—	108
3 jours	56	—	—	54
8 jours	15	traces	—	traces
21 jours	31	traces	—	—
			65	
Plante adulte	84	16	R mgl 15	—

* Voir Tableau 1.: les analyses ont été effectuées avec les organes de 5 plantes.

Tableau 5. Analyse des folioles des plantes adultes

Organe	Poids moyen (mg)	Quantité des Hétérosides* ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ et $\%$ rel)	
		A mg/l	R mg/l
Bourgeons			
Moyenne de 6 folioles	1.7	187(13)	1.266(87)
de 3 plantes différentes	5	262(17)	1.312(83)
	6	634(29)	1.661(71)
Plante A			
Foliole insertion 3	24	46(10)	461(90)
Foliole insertion 6	45	18(7)	275(93)
Plante B			
Bourgeons	3	416(19)	1.833(81)
moyenne de 6 folioles			
Foliole insertion 3	30	140(21)	533(79)
Foliole insertion 6	48	144(25)	450(75)

* Voir Tableau 1.: Tous les résultats présentés sont obtenus par analyse d'échantillons contenant 3 à 6 folioles.

mentionnés dans le tableau. En effet tous les autres glucosides ne sont pas décelables à part quelques traces d'émidine anthrone monoglucoside. Dans toutes les feuilles des diverses plantes on voit que la rhéine anthrone monoglucoside est prépondérante et que la proportion de ce glucoside varie de 70 à 95%. Même dans les feuilles les plus jeunes du bourgeon on trouve déjà 70 à 87% de rhéine anthrone. Aussi dans les tiges de la plante adulte (Tableau 3) on trouve presque exclusivement le monoglucoside de rhéine anthrone. Dans les racines, au contraire, le pourcentage de rhéine anthrone sous forme de ses mono- et di-glucosides est à peu près égal à celui du chrysophanol + physcion diglucoside (Tableau 4).

La plante adulte semble donc synthétiser principalement et même dans les feuilles les plus jeunes, la rhéine anthrone, à côté de faibles quantités d'aloé-émidine anthrone et des traces d'émidine anthrone.

Il est à noter que dans toutes les parties de la plantule analysée les formes dimères, les dianthrone, sont absentes. Seulement des traces de ces dimères (maximum 5% du total) sont présentes dans les folioles de la plante adulte. La forme dimère est donc un produit qui est formé après le séchage des feuilles et n'est pas formé dans la plante vivante. Nous avons constaté que l'oxydation des anthrones en dianthrone ne se fait que pendant le séchage à des températures de 30–40°. En effet si on sèche les feuilles fraîches à l'étuve à 100° il n'y a aucune formation de sennosides et la

plus grande partie des anthrones est détruite. La transformation des anthrones pendant le séchage fera l'objet d'une étude séparée.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel végétal. Les graines de *Cassia angustifolia* furent isolées des gousses de commerce et ensemencées en serre (22° à 35°) sous lumière artificielle (16 h par jour: 12 500 lm à 50 cm du niveau des plantes: humidité 70–80%). Après 5 mois les plantes avaient développé ± 15 insertions de feuilles.

Dosage des hétérosides anthroniques. Le matériel végétal fut immédiatement analysé après la récolte en triturant env. 100 mg de substance fraîche avec 0.5 ml de réactif (une solution de 0.1% de *p*-nitrosodiméthylaniline dans la pyridine). On centrifuge et la solution obtenue contient les dérivés des hétérosides anthroniques. Cette solution est stable en la conservant à -10° . Sur des plaques de gel de silice (20 \times 20 cm, Merck) on applique 3 taches de 1 μg et 3 taches de 3 μg de l'étalon (le monoglucoside de rhéine anthrone) et alternativement 6 taches de la solution à analyser de telle façon que les quantités appliquées se situent entre celles de la substance étalon. On développe avec le mélange EtOAc-MeOH-H₂O (100:17:13) sur un parcours de 10 cm. Pour stabiliser les couleurs on pulvérise 25 ml du mélange formamide-(Me)₂CO-EtO (10:30:60). Les chromatogrammes sont mesurés au moyen du densitomètre Zeiss selon Stahl, muni d'un dispositif de mesure simultanée de transmission et de rémission. La mesure se fait à 540 nm avec un rapport $R/T = 100/50$.

Les surfaces des pics enregistrés sont déterminées. Les résultats sont calculés à partir des carrés des surfaces et exprimés par rapport à la matière fraîche non-desséchée.

Erreur de la méthode: $\pm 5\%$.

Isolation et identification des diglucosides. Les organes lyophilisés des plantes ($\pm 1 \text{ g}$) contenant les diglucosides sont triturés avec 10 ml d'une solution de 0.2% de nitrosodiméthylaniline dans la pyridine. Cette solution est appliquée en bandes sur des plaques de gel de silice. On développe avec le mélange EtOAc-MeOH-H₂O et les bandes correspondant aux diglucosides sont grattées. Les dérivés des diglucosides sont extraits au moyen d'eau chaude. La génine est obtenue par oxydation et hydrolyse

et identifiée par chromatographie en comparaison avec des substances témoins. Les génines chrysophanol, aloé-émodyne et rhéine furent identifiées. La teneur en glucose est déterminée par réaction avec le réactif anthrone-acide sulfurique, 2 molécules de glucose par génine furent trouvées. L'identification des sucres a été effectuée après hydrolyse dans H_2SO_4 à 5% pendant 15 min. La chromatographie montre la présence d'un bioside. Ce bioside fut identifié par comparaison avec des biosides témoins dans deux systèmes de chromatographie et après réaction avec différents réactifs des oses. Les valeurs R_f et les réactions colorées indiquent le gentiobiose. Les diglucosides mis en évidence sont donc les gentiobiosides de chrysophanol, d'aloé-émodyne et de rhéine. Le lieu d'attachement du gentiobiose à la génine ne fut pas déterminé.

Détection des sennosides. Toutes les parties des plantules et des plantes adultes furent également analysées pour la présence des dianthrone glucosides, les sennosides. Pour l'extraction, on procède de la même façon comme décrit pour le dosage des hétérosides anthroniques. Toutefois il faut appliquer la solution obtenue immédiatement sur les plaques de gel de silice afin d'

éviter toute détérioration des sennosides. On développe avec le mélange EtOAc-PrOH- H_2O (40:40:30). Révélation: HNO_3 25% à 100° pendant 10 minutes suivi par KOH 5%. Les sennosides apparaissent en brun violet. Limite de détection: 0,5 μg . On estime les quantités par référence à des étalons. Dans aucun cas plus de 5% du total des glucosides présents furent identifiés comme sennosides.

REFERENCES

1. Fairbairn, J. W. et Shrestha, A. B. (1967) *Phytochemistry* **6**, 1203.
2. Saber, A. H., Balbaa, S. E. et Award, A. T. (1962) *Bull. Fac. Pharm. Cairo* **1**, 7.
3. Friedrich, H. et Baier, S. (1973) *Planta Med.* **23**, 74.
4. Tsukida, K. (1957) *Planta Med.* **5**, 97.
5. Lemli, J. et Cuveele, J. (1974) *Planta Med.* **26**, 193.
6. Fairbairn, J. W. et Shrestha, A. B. (1966) *J. Pharm. Pharmacol.* **18**, 467.