



SAPOGENINES ET SAPONINES DE DEUX ESPECES D' ALBIZZIA DE NOUVELLE-CALEDONIE

L. VILELA ALEGRIO, Catherine LAVAUD, G.MASSIOT, L.LE MEN-OLIVIER

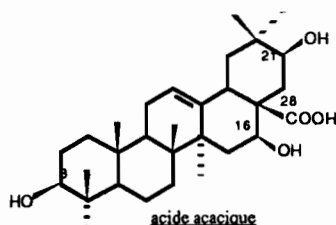
Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, 51 rue Cognacq Jay,
51096 Reims Cédex France

Résumé: Les espèces du genre *Albizzia* appartiennent aux Légumineuses (Mimosacées) des régions tropicales et subtropicales. Leurs extraits possèdent des activités biologiques importantes telles que: cytotoxique, antiparasitaire, immunostimulante. Les écorces et les fleurs de ces arbres renferment une quantité importante de saponosides. *Albizzia granulosa* et *A.streptocarpa* originaires de Nouvelle-Calédonie contiennent respectivement 1,5 et 0,5 % de saponines. La structure des saponines d'*Albizzia* sont généralement difficiles à résoudre car elles contiennent trois parties qu'il faut assembler: un triterpène, des sucres et des acides. Les structures des sapogénines, des prosapogénines et des saponines de ces deux espèces sont déduites des informations des spectres de RMN 1D et 2D.

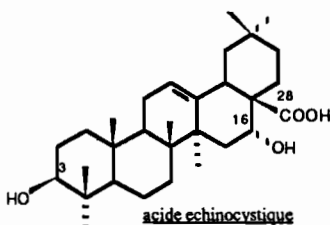
Abstract: *Albizzia* are leguminous plants (Mimosoidaceae) distributed in tropical and subtropical areas. Their extracts display strong biological activities such as : cytotoxicity, antiparasitic, immunostimulant. Bark and flowers of these trees contain important quantities of saponins. Bark of *Albizzia granulosa* and *A.streptocarpa* from New-Caledonia contain 1.5 and 0.5 % of saponins respectively. Structures of saponins from *Albizzia* are usually difficult to solve because they contain three elements which one must sequence: a triterpene, sugars and acids. Using a combination of 1D and 2D NMR, structures of sapogenins, prosapogenins and saponins from these two species are described.

Les *Albizzia* sont des arbres des régions tropicales et subtropicales d'Asie et d'Afrique; certaines espèces sont également rencontrées comme arbres ornementaux autour du bassin méditerranéen. Les plus connues sont *Albizzia lebeck* en Afrique, Inde et Asie, *Albizzia adianthifolia* en Afrique, *Albizzia julibrissin* en Chine et en mer Caspienne, et *Albizzia anthelmintica* d'Afrique. Leur utilisation en médecine traditionnelle est très ancienne et des plus variées. Ces propriétés sont celles rencontrées habituellement chez les plantes à saponosides. En effet ces arbres renferment dans toutes leurs parties une quantité assez importante de saponines triterpéniques.

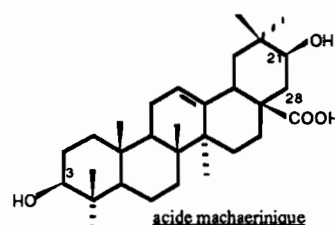
Les triterpènes isolés sont à squelette Δ -12 oléanène et possèdent de nombreuses fonctions alcools et une fonction acide en C-28. Il s'agit principalement de l'acide acacique qui a été isolé à plusieurs reprises dans différentes espèces d'*Albizzia* et qui possède trois hydroxyles en 3,16 et 21 en positions β équatoriales, l'acide échinocystique et l'acide machaerinique.



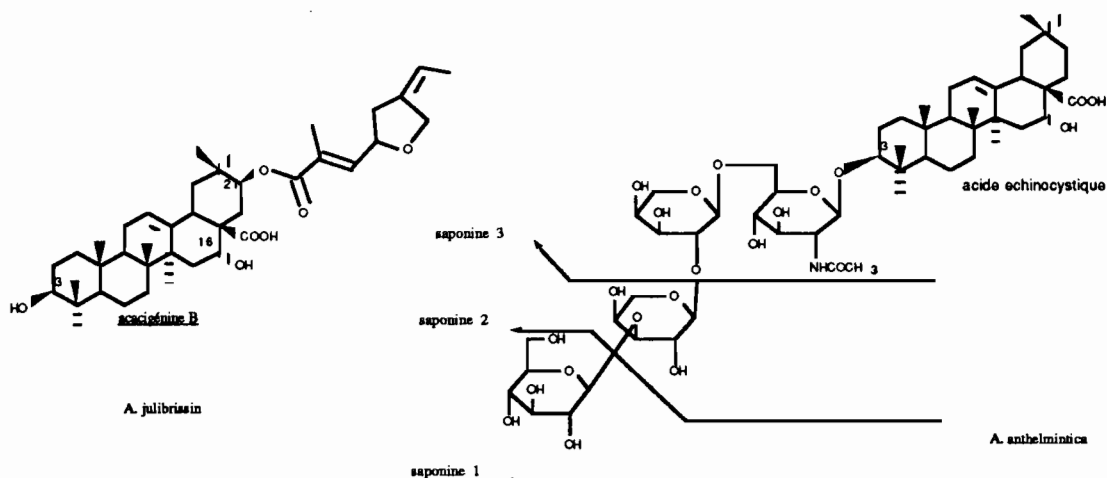
A. adianthifolia *A. stipulata*
A. boromensis *A. zygia*
A. glaberrima *A. ferruginea*



A. lebeck
A. anthelmintica



A. julibrissin
A. procera



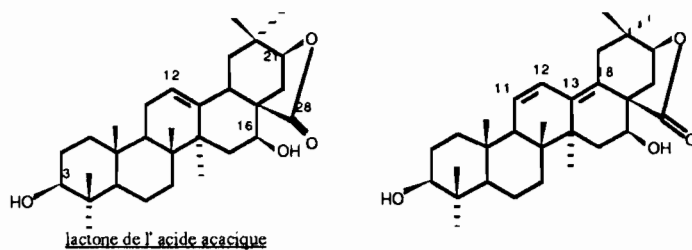
Les structures actuellement connues de prosapogénines et de saponines d'*Albizzia* sont encore peu nombreuses. Pour les prosapogénines, deux ont été isolées: l'acacigénine B à acide acacique et une seconde à acide machaerinique comme aglycone. Ces deux composés sont estérifiés en 21 par le même monoterpène.

D'*Albizzia anthelmintica*, trois saponines à acide échinocystique ont vu leurs structures établies. Ces composés possèdent une chaîne de 2 à 4 unités osidiques linéaires sur le C-3. L'un des oses est une N-acétylglucosamine. Les saponines 2 et 3 pourraient provenir de la dégradation de la saponine 1.

Nous nous sommes intéressés à deux espèces d'*Albizzia* originaires de Nouvelle-Calédonie. Les écorces de ces deux arbres ont été récoltées par le Docteur Thierry Sévenet. Il s'agit d'*Albizzia streptocarpa* et *Albizzia granulosa*.

A l'origine de ce travail, nous nous étions proposés d'extraire, de purifier, et d'analyser les saponines de ces deux espèces selon la méthodologie mise au point au laboratoire. C'est à dire sans dégradation du produit en utilisant essentiellement les informations recueillies des spectres de RMN 1D et 2D à haut champ (300 MHz). Ces études ont été menées sur les dérivés peracétylés afin d'obtenir des composés plus facilement purifiables, solubles dans le deutérochloroforme, et fournissant des spectres plus étalés et plus riches en informations. La complexité des produits isolés nous a amené à étudier en préliminaire les génines de ces deux espèces pour résoudre la structure des saponosides.

Après une extraction classique des saponines, l'hydrolyse acide peu poussée de celles-ci engendre la formation de génines simples et de prosapogénines que nous étudierons ensuite

RMN ¹H

H-3	3,22 ppm	3,24 ppm	dd-11,5; 5 Hz
H-16	4,01 ppm	4,28 ppm	dd-12; 5 Hz
H-21	4,24 ppm	4,32 ppm	d-5 Hz
H-12	5,39 ppm t1-3 Hz	5,70 ppm	d-3 Hz
H-11		6,30 ppm	dd-10; 3 Hz

RMN ¹³C

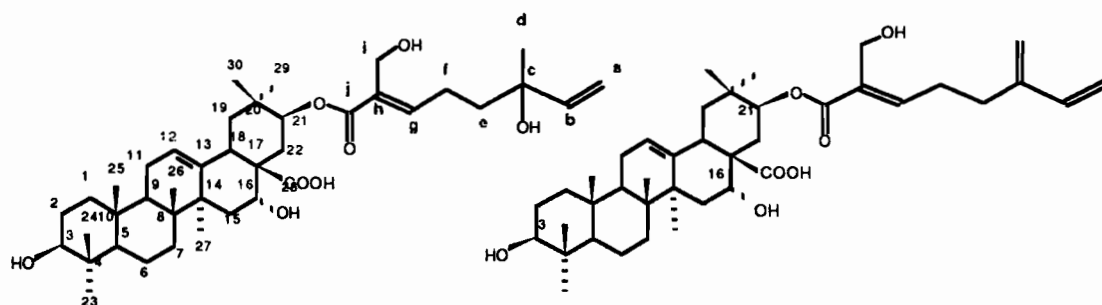
C-28	181 ppm	181 ppm
C-11; C-12		128; 125 ppm
C-13; C-18		136; 126 ppm



Parmi les composés simples, nous avons isolé la lactone 21-28 de l'acide acacique et un composé diénique. La structure de ces deux produits est réalisée d'après l'analyse des spectres de RMN ^1H et ^{13}C . Les protons H-3 et H-16 respectivement vers 3 et 4 ppm sont des doublets de doublets caractéristiques de protons axiaux. Le proton H-21 vers 4,2-4,3 ppm sort sous la forme d'un doublet $J = 5$ Hz. Cette valeur de couplage est intermédiaire entre diaxiale et axiale-équatoriale. La présence de la lactone entraîne une conformation bateau pour le cycle E et une forme croisée du cycle D. L'analyse des déplacements chimiques ^{13}C montre bien des effets g anti ou g e de l'ordre de -1 à -2 ppm sur les carbones 14, 17 et 19 par rapport à un triterpène réduit comme l'hédéragénine par exemple. Ceci confirme les positions β équatoriales des hydroxyles 16 et 21.

Le composé diénique conjugué présente un système AMX à petite constante de couplage entre H-11 et H-12; la constante de 10 Hz étant celle reliant H-11 à H-9.

A côté de ces génines simples nous avons isolé deux prosapogénines à acide épi-16 acacique. Elles possèdent en 21 un ester monoterpénique en C 10. Le second produit pourrait provenir de la déshydratation du premier lors de l'hydrolyse acide. La démarche suivie pour établir leurs structures repose essentiellement sur les résultats de deux expériences de RMN 2D hétéronucléaires C, H : l'HMQC et l'HMBC. La structure du premier composé sera développée.



Sur le spectre proton nous comptons entre 0,5 et 1,2 ppm les sept méthyles angulaires du triterpène, les protons en α des hydroxyles: H-3 à 2,9 ppm, H-16 à 4,2, H-21 à 5,1 et le proton éthylénique H-12 à 5,1 ppm. Dans cette partie du spectre on observe en plus six protons : les protons a et b à 4,9 et 5,6 ppm formant un système vinylique, le proton g éthylénique à 6,6 ppm triplet voisin d'un CH_2 , les protons i d'un CH_2OR à 4,2 ppm. A 1 ppm apparaît un méthyle singulet supplémentaire d .

Sur le spectre carbone on retrouve le système vinylique $a-b$ (131-145 ppm), le système éthylénique $h-g$ (112-143 ppm), l'alcool primaire i (60 ppm), le méthyle d (23 ppm) et un carbonyle d'ester j (166 ppm) et un carbone c d'alcool tertiaire (78 ppm).

Pour résoudre la structure de ces prosapogénines, il est nécessaire de répondre à trois questions:

- confirmation de l'acide acacique comme aglycone,
- structure du monoterpène ester
- liaison génine-monoterpène

La structure de l'aglycone est déduite des informations tirées de l'expérience HMBC c'est à dire l'expérience reliant les protons aux carbones par les petits couplages ^2J et ^3J C-H. Ceci nécessite évidemment de connaître quelques protons ou carbones. (figure 1)

La COSY H-H confirme la position des protons déblindés H-12, H-16, H-3 et H-21 d'après leurs corrélations avec des protons situés à droite: H-12/ les H-11, H-21/les H-22, H-16/les H-15, H-3/les H-2 et H-18/les H-19. Les autres protons situés à gauche du spectre sont ceux du monoterpène.

Par l'expérience HMQC c'est à dire reliant les protons aux carbones par le ^1J C-H, il est aisé de repérer les carbones correspondants C-12, C-16, C-3 et C-21. Le C-13 est facilement attribué d'après sa multiplicité et son déplacement chimique sur le spectre ^{13}C Jmodulé. Les CH 5 et 9 sont les plus déblindés du fait de leur position trans en jonction de cycle.

A partir de ces carbones par les couplages ^3J C-H nous accrochons sur l'HMBC les différents protons des méthyles du triterpène. Une fois que les méthyles sont attribués en proton,



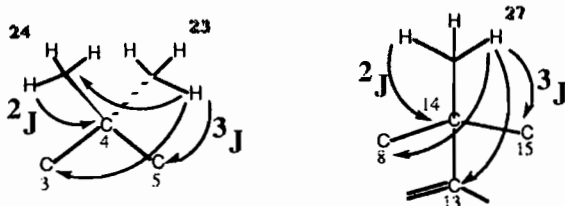
les corrélations 2J et 3J C-H qu'ils présentent, permettent d'attribuer les résonances des autres carbones et ainsi d'avoir la structure du triterpène (figure 1).

C'est en fait l'expérience HMBC, source de nombreuses et multiples informations, qui fournit la réponse aux trois questions: génine? monoterpène? liaison?

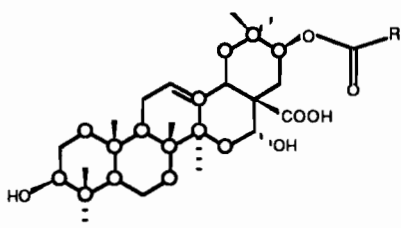
Le C-3 accroche les protons 23 et 24 par un 3J , le C-13 les protons 27, le C-5 les protons 23, 24 et 25, le C-9 les protons 25 et 26, et le C-21 les protons 29 et 30. A partir de ces méthyles on observe des corrélations avec les autres carbones du socle de base :

-un 2J avec le carbone quaternaire porteur du méthyle. Par exemple le C-4 pour les protons du méthyle 23 ou 24; le C-14 pour les protons 27.

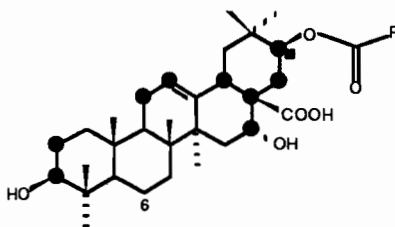
-deux 3J avec les carbones adjacents. Par exemple les C-5 et C-24 pour les protons 23; les C-5 et C-23 pour les protons 24; les C-15 et C-8 pour les protons 27. Et ainsi pour chacun des sept méthyles angulaires du triterpène.



Ci-dessous figure à droite les résultats obtenus à partir des protons des méthyles par l'HMBC; les carbones attribués sont marqués d'un cercle et sont au nombre de 14 plus les 7 méthyles. Les carbones restants seront attribués par l'HMQC (C-H directe) : C-12, C-18, C-21 et C-16, ou par l'HMBC à partir des protons individualisés: H-3, H-16, H-12, H-21 et H-18. Seul restera un CH_2 qui sera le C-6.

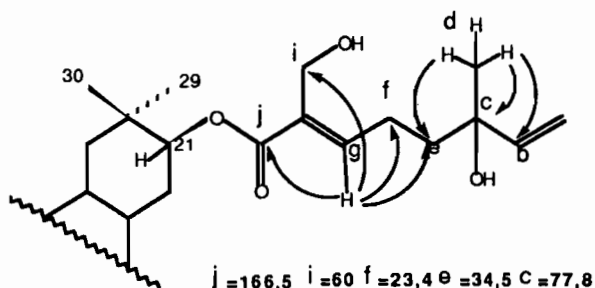
HMBC à partir des CH_3 

HMQC et HMBC



Pour la structure du monoterpène c'est également l'HMBC qui est l'outil de choix. Le méthyle singulet restant **d** corrèle à trois carbones: un CH_2 **e**, un C quaternaire d'alcool tertiaire **g** et un CH éthylénique **b**. Nous savons d'après la COSY que les protons **b** et **a** forment un vinyl; nous avons donc la structure de l'unité terminale en C5 : le radical hydroxy-2 méthyl-2 butèn-3 yl.

Dans la partie gauche de l'HMBC, le proton éthylénique **g** donne des corrélations avec deux CH_2 blindés **f** et **e**, un CH_2 d'alcool **i** et le carbonyle **j**. Ces corrélations fournissent la structure de la deuxième unité terpénique : le radical 4-(2-hydroxy méthyl butèn-2 oyl).





C'est donc les corrélations 3J sur le carbone **e** avec les protons **g** et **d** qui permettent de relier ces deux unités. Reste à résoudre la liaison génine - ester. Ceci nécessite d'observer en HMBC un 3J entre le carbonyle de l'ester et le proton de la génine, ici il s'agit du H-21.

Une telle corrélation est observée. Il s'agit bien du proton 21 puisqu'il corrèle également avec les carbones 29 et 30 (les méthyles du cycle E).

L'étude préliminaire des génines nous montre que les saponines isolées seront complexes. Elles posséderont certainement l'acide acacique ou sa lactone comme génine, un ester monoterpénique en 21 et des sucres en 3, 16 ou 28.

La RMN du ^{13}C et les expériences HMQC / HMBC permettent donc de déterminer la structure de l'aglycone et des acides terpéniques présents. Pour les sucres ce seront les expériences COSY H-H et ses variantes: COSY retardée, COSY relayée, et l'expérience HOHAHA qui nous renseigneront sur leur nombre et leurs structures.

Ensuite se posera le problème de l'assemblage de ces différents éléments, c'est à dire le séquençage :

- génine-sucre : s'il s'agit de liaison éther (en 3 ou 16) l'effet Overhauser observé sur l'expérience ROESY entre le proton anomère du sucre et le proton de la génine sera précieux à observer. Le couplage 3J C-H entre le carbone de la génine (alcool ou acide) et le proton anomère du sucre pourra être observé aussi bien dans le cas de liaison éther que de liaison ester. Pour cette dernière, l'HMBC sera le seul moyen pour localiser la chaîne osidique ester.

- sucres-sucres : la technique de choix sera l'effet Overhauser entre protons osidiques (anomère et substitué) sur la ROESY. L'HMBC pourra également fournir de façon hétéronucléaire ces liaisons.

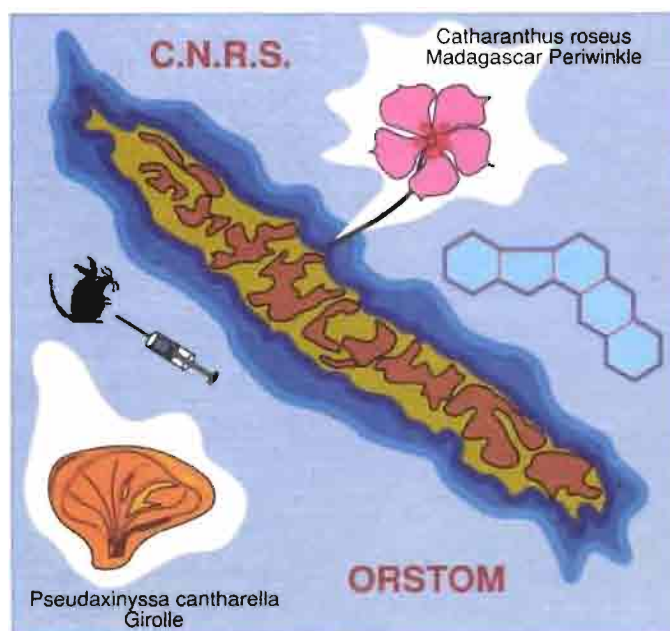
- génine-acide terpénique : nous venons de voir que l'HMBC fournissait la réponse. Actuellement nous avons isolé quatre saponines des deux espèces d'*Albizzia* étudiées. L'établissement de leurs structures est en cours et reste délicate étant donné le nombre élevé d'unités osidiques et pour certaines la présence d'esters monoterpéniques instables qui engendrent des mélanges complexes. A ceci s'ajoute le problème de leur purification qui demeure pour l'étude de ces composés un handicap majeur.

figure 1

Troisième Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie

Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 26-30 Août 1991

ACTES



Editeurs : Cécile DEBITUS, Philippe AMADE,
Dominique LAURENT, Jean-Pierre COSSON