

## MÉMOIRES ORIGINAUX

### Sur les feuilles de deux Quinquinas de Madagascar (*Cinchona ledgeriana* Moens et *C. succirubra* Pavon) Étude particulière des polyphénols (acides-phénols, anthocyanes et flavonoïdes) (\*)

R. R. PARIS et H. JACQUEMIN (\*\*)

Laboratoire de Matière médicale, 4, avenue de l'Observatoire, F 75270 Paris Cedex 06

RÉSUMÉ. — Dans les feuilles de *Cinchona succirubra* ont été caractérisés des acides-phénols (protocatéchique, *p*-coumarique, caféique, chlorogénique), des anthocyanosides (cyanidol-3 glucoside et cyanidol-3 rhamnoglucoside) et cinq hétérosides flavoniques : trois sont des monosides ou des biosides dérivés du quercétol, les deux autres sont des hétérosides de kaempférol ou d'isorhamnétol. Le *Cinchona ledgeriana* est moins riche en flavonoïdes qui sont analogues aux précédents.

Les écorces des Quinquinas ont fait l'objet de nombreux travaux chimiques, notamment en ce qui concerne les alcaloïdes, les feuilles ont été moins étudiées sans doute parce que des essais déjà anciens ont montré qu'elles contenaient non seulement peu d'alcaloïdes, mais encore qu'il n'y avait pas de quinine. Cependant, a déjà été envisagée la constitution chimique des feuilles de Quinquinas de l'ex-Congo belge (DELVAUX 1957 [3]), de Guinée et du Vietnam (LI MEN et coll. 1956 [6]), tout au moins en ce qui concerne les alcaloïdes : la composition des feuilles de Quinquinas malgaches n'a pas encore été examinée, tout au moins à notre connaissance.

Les *Cinchona* sont cultivés dans la Grande Ile, soit dans le Nord, dans la région de la Montagne d'Ambre, soit dans l'Est, dans la vallée de la Mandraka. Les écorces de *Cinchona succirubra* renferment de 5 à 8 %, d'alcaloïdes totaux dont 2 à 4 %, de quinine. Les chiffres sont un peu plus élevés pour *C. ledgeriana* (BARANGER [2], LI POGAM [7]) Pour les feuilles, nous avons trouvé des teneurs voisines de 0,50 % : des essais en chromatographie sur couche mince suivant la

(\*) Mémoire présenté à l'Académie de Pharmacie, séance du 4 décembre 1974.

(\*\*) Avec la collaboration technique d'A. HERBET et A. LINARD.

Tirés à part : R. R. PARIS (à l'adresse ci-dessus).

29 AOÛT 1977  
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° M 8671 BB V

technique de la Pharmacopée [12] n'ont pas permis de mettre en évidence de quinine, confirmant ainsi les expériences de LE MEN et coll. [6] effectuées avec des feuilles de Quinquinas d'autres provenances géographiques. Des essais préliminaires ayant montré l'absence de saponosides, d'hétérosides cyanogénétiques mais la présence de substances polyphénoliques (anthocyanes, leucoanthocyanes, acides-phénols, flavonoïdes et tanins catéchiques), nous avons entrepris une étude plus approfondie de certains de ces constituants.

*Les acides-phénols* ont été séparés par une méthode classique dans notre laboratoire [4]. L'infusé acidifié par l'acide sulfurique est épuisé par l'éther. Celui-ci est traité par le carbonate acide de sodium; après réacidification, les liqueurs aqueuses sont de nouveau épuisées par l'éther. Le résidu éthéré est soumis à la chromatographie en couche mince de cellulose. Trois solvants sont utilisés : — acide acétique à 2 et à 15 % — acide chlorhydrique *N/10*, en présence de témoins externes et internes. On emploie comme révélateurs la paranitraniline et le chlorure ferrique.

Dans ces conditions, on pu être caractérisés des acides de la série benzoïque (protocatéchique) et de la série cinnamique (p-coumarique, caféique, chlorogénique); une tache jaune ocre de *Rf* 0,30 dans l'acide acétique à 2 %, spectre UV :  $\lambda$  max 280 nm, épaulement à 316 nm n'a pu être identifiée. Les résultats sont tout à fait analogues pour les 2 espèces examinées: *C. ledgeriana* et *C. succirubra*.

*Les anthocyanes* — pour ces recherches, les échantillons ont été examinés à l'état frais, la récolte ayant lieu sur de jeunes arbres cultivés à la station des Eaux et Forêts de la Mandraka. Nous nous sommes adressés, d'une part, à des jeunes limbes et, d'autre part, à des feuilles sénescents; dans les deux cas, les organes présentaient une teinte rougeâtre assez accentuée.

Les feuilles fraîches sont mises à macérer pendant 48 heures dans du méthanol renfermant 1 p. 100 d'acide chlorhydrique — le traitement est renouvelé deux fois, les colatures sont concentrées sous pression réduite jusqu'à consistance d'extrait mou — celui-ci, redissous dans HCl 2*N*, est hydrolysé au bain-marie bouillant pendant 3 heures de façon à obtenir les génines. La solution encore chaude est épuisée par de l'alcool isoamylique. Ce dernier est examiné en chromatographie sur papier pour la caractérisation des anthocyanidols; avec le butanol acétique de PARTRIDGE ou le mélange acéto-chlorhydrique de FORESTAL, on obtient une seule tache qui par son *Rf* et ses réactions colorées, a été identifiée au cyanidol. D'autre part les solutions initiales avant hydrolyse soumises à la chromatographie avec, comme solvants, l'acide chlorhydrique à 1 %, les mélanges A : butanol I. HCl, eau (7-2-5) ou B : eau, acide acétique, HCl 12 *N* (82-15-3 vol/vol) fournissent deux taches distinctes correspondant à un monoside, identifié au cyanidol-3 glucoside et un bioside : cyanidol-3 rhamnoglucoside. L'hydrolyse partielle avec le mélange HCl à 1 %, méthanol, suivant la technique de ABE et HAYASHI [1] fournit une tache intermédiaire correspondant au 5-monoglucoside. Les deux espèces de *Cinchona* possèdent les mêmes pigments anthocyaniques; on les retrouve aussi bien chez les jeunes feuilles que chez les feuilles sénescents.

*Flavonoïdes*. Les premiers essais ont été effectués sur les feuilles de *Cinchona succirubra* qui, d'après les recherches préliminaires, paraissait le plus riche en ces pigments, en particulier l'infusé à 10 % fournit une coloration rose-rouge avec le magnésium chlorhydrique indiquant la présence de flavonols (réaction dite de la cyanidine). Nous avons procédé à un dosage spectrophotométrique suivant la méthode habituelle du laboratoire [9], la teneur est voisine de 2,60 % de flavonoïdes totaux exprimés en rutoside.

Il a été procédé ensuite à l'étude des *génines flavoniques*: après hydrolyse de l'infusé à 10 % par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> *N* pendant 2 heures au bain-marie bouillant et épauement par l'éther. La chromatographie préparative sur couche mince de cellulose avec 3 solvants : I : butanol acétique de PARTRIDGE; II : solvant de FORESTAL (acide acétique - eau - HCl concentré 10-10-3 v/v); III : acide acétique - eau (10-40 v/v) a permis de séparer deux bandes jaunes principales, l'une se colorant en orange avec le sous-acétate de plomb, l'autre de teinte jaune, qui ont été identifiées,

respectivement au quercétol (a) et au kaempférol (b) par leur Rf : a - 0,72 (I) 0,42 (II) 0,26 (III); b - 0,89 (I) 0,62 (II) 0,43 (III) et les spectres ultraviolets (appareil Beckman DB) a- $\lambda$  max (alcool) bande I 372 et bande II 296; + AlCl<sub>3</sub> 428 et 394 - 266 nm; + acétate de sodium 380 et 268 nm; + acétate de sodium et acide borique 388 et 259 nm. — b- $\lambda$  max (alcool) 365 et 267; + AlCl<sub>3</sub> 422, 306-268; + acétate de sodium 380 et 270; + acétate de sodium et acide borique 372 et 267 nm.

Il existe aussi de petites quantités d'une troisième génine, difficile à différencier du kaempférol. Cette génine peut être séparée par l'acide acétique à 50 %; Rf = 0,18. Elle a été identifiée au 3'-méthylquercétol ou isorhamnétol (coloration jaune avec l'acétate basique de plomb).

Quant aux *hétérosides flavoniques*, ils ont été extraits par la technique classique dérivant de la méthode de CHARAUX-PARIS [9] : traitement à l'alcool bouillant, reprise par l'eau bouillante et, après filtration, épaissements successifs par l'éther (qui contient des traces de génines: quercétol et kaempférol), l'acétate d'éthyle et le butanol. L'acétate d'éthyle renferme la majeure partie des flavonosides (hétéromonosides et biosides). Une première purification est obtenue soit sur colonne de silice (éluant : solvant de EGGER : eau, ethanol, méthyléthylcétone, acétyl-acétone (13-3-3-1), soit sur colonne de polyamide avec comme solvant : benzène, méthyléthylcétone, méthanol (100-50-50); la séparation finale est effectuée en chromatographie sur couche mince de cellulose avec l'acide acétique à 15 %.

On obtient ainsi cinq flavonosides dénommés A.B.C.D.E.

**SUBSTANCE A** : de Rf 0,15 - 0,18 dans le solvant de EGGER, correspond à un monoside : teinte mate sous UV, jaune après AlCl<sub>3</sub>, orangée avec le sous-acétate de plomb, elle fournit par hydrolyse acide du glucose et du quercétol. Elle a été identifiée à l'isoquercitroside (quercétol 3-glucoside). Cette substance est accompagnée de traces de quercétol 3-galactoside.

**SUBSTANCE B** : de Rf 0,38 - 0,40 dans le mélange de EGGER; correspond à un bioside. Les réactions colorées sont analogues à celles de l'hétéroside précédent (dérivé du quercétol). Elle donne par hydrolyse du quercétol et deux sucres : glucose et rhamnose; il s'agit du rutoside : quercétol-3 rhamnoglucoside.

**SUBSTANCE C** : se comporte aussi comme un bioside et un dérivé du quercétol (coloration or orangée avec le sous-acétate de plomb); par hydrolyse acide sont caractérisés 2 sucres : galactose et rhamnose.

**SUBSTANCE D** : donne une coloration jaune avec le sous-acétate de plomb. D'après les Rf en chromatographie, ce serait un bioside (Rf 0,43 dans solvant de PARTRIDGE, 0,25 dans l'eau, 0,86 dans l'acide acétique à 15 %); après hydrolyse acide est obtenu de l'isorhamnétol (mais aussi des traces de kaempférol) et des sucres (glucose et rhamnose) (avec des traces de galactose). Ce produit est impur, mais constitué en grande partie par un rhamnoglucoside d'isorhamnétol.

**SUBSTANCE E** : donne aussi une teinte jaune avec l'acétate de plomb (pas de diphenol en ortho). Le Rf pour les 3 solvants indiqués précédemment sont respectivement de 0,55, 0,30 et 0,70; l'hydrolyse acide donne du kaempférol (accompagné d'un peu d'isorhamnétol) et deux sucres : glucose et rhamnose (comme précédemment nous avons caractérisé en plus un peu de galactose). Cette substance E est à rapprocher du nicotifloroside (kaempférol-3 rhamnoglucoside), homologue du rutoside.

Les résultats sont sensiblement de même ordre avec les feuilles de *Cinchona ledgeriana* mais celui-ci est moins riche en flavonoides totaux : 1,20 %, exprimés en rutoside. Les génines sont constituées principalement par des flavonols : kaempférol et surtout quercétol, accompagné de son dérivé méthylé en 3', l'isorhamnétol. Les hétérosides sont surtout des dérivés du quercétol : rutoside et isoquercitroside, les dérivés du kaempférol ne sont présents qu'à l'état de traces.

En résumé au point de vue chimiotaxonomie des polyphénols il y a peu de différence entre les deux espèces de Quinquinas examinées. Le genre *Cinchona*, contrairement à ce que se passe pour les *Coffea* [8], paraît assez homogène. A

propos de la chimiotaxonomie de la famille des Rubiacées, il faut remarquer que le quercétol et le kaempférol y sont assez fréquents. Jusqu'ici l'isorhamnétol n'avait pas été signalé (peut-être est-ce dû à sa séparation difficile du kaempférol); nous n'avons pas trouvé chez les feuilles de *Cinchona* de dérivés trihydroxylés : acide gallique, myricétol, ni de C-flavonosides [10] rencontrés dans d'autres genres de cette famille, par contre le galactose trouvé par nous existe sous forme de quercétol 3-galactoside chez certaines Rubiacées [14]. Si le genre *Cinchona* paraît homogène au point de vue des polyphénols, il n'en est pas de même pour les différentes tribus de la famille des Rubiacées qui peuvent contenir des flavonoïdes de types variés.

## SUMMARY

About two malagasian *Cinchona*'s leaves (*Cinchona ledgeriana* Moens and *C. succirubra* Pavon) particular study of polyphenols (phenolic acids, anthocyanins and flavonoids).

by R. R. Paris and H. Jacquemin (Paris)

*In the leaves of Cinchona succirubra were characterized phenolic acids : protocatechic, p-coumaric, caffeic and chlorogenic acids; anthocyanins (cyanidol-3 glycoside and cyanidol-3 rhamnoglycoside); and five flavonol-glycosides: quercetol-3 glycoside, quercetol-3 rhamnoglycoside, a rhamno-galactoside of quercetol and rhamno-glycosides of isorhamnetol and kaempferol. C. ledgeriana is poorer in flavonoids, but its constituents are about the same.*

## BIBLIOGRAPHIE

- [ 1 ] ABE (Y.) et HAYASHI (X.). — *Bot. Mag. Tokyo*, 1956, 69, p. 577.
- [ 2 ] BARANGER (A.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 73, p. 48.
- [ 3 ] DELVAUX (A.). — *Bull. agric. Congo belge*, 1957, 48, p. 1137.
- [ 4 ] DURET (S.) et PARIS (R. R.). — *Pl. méd. et Phyt.*, 1970, 4, p. 158.
- [ 5 ] JACQUEMIN (H.). — Recherches sur les anthocyanes foliaires de trois arbres tropicaux (*Mangifera indica* L., *Theobroma cacao* L., *Lophira alata* Banks. Thèse Doct. Sc., Paris, 1969.
- [ 6 ] LE MEN (J.), KAN (C.), POTIER (P.) et JANOT (N. M.). — *Ann. pharm. fr.*, 1965, 23, p. 691.
- [ 7 ] LE POGAM (J.). — *Soc. Biol.*, 21 novembre 1972.
- [ 8 ] PARIS (R. R.). — *C.R.Ac.Sc.*, 1972, 275 série D, p. 1617.
- [ 9 ] PARIS (R. R.) et NOTHIS (A.). — *Pl. méd. et Phyt.*, 1970, 4, p. 63.
- [10] PARIS (R. R.) et DEBRAY (M.). — *Pl. méd. et Phyt.*, 1973, 7, p. 135.
- [11] PARIS (R. R.) et JACQUEMIN (H.). — *C.R.Ac.Sc.*, 1970, 270, p. 3232.
- [12] Pharmacopée française IX<sup>e</sup> édition, 1972, 1<sup>re</sup> partie, p. 523.
- [13] QUEVAUVILLER (A.), FOUSSARD-BLANPIN (O.), SARRAZIN (G.), BOURRINET (M. P.) et NAKAJI (Y.). — *Ann. pharm. fr.*, 1960, 27, p. 397-402.
- [14] REZNIK (H.). — *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 1964, 77, p. 54.