

ANNEXE IETUDE CHIMIQUE DE BUXUS MADAGASCARICA Baill.  
(Ecorces de racine)Buxacées

C'est un arbuste de 2 à 5 mètres environ, très ramifié, glabre, à feuilles persistantes, opposées, rigides, coriaces, petites, lancéolées.

TESTS PRELIMINAIRES

Les tests chimiques préliminaires ont été effectués sur deux échantillons récoltés au même endroit, mais à des époques différentes (Mai 1968 et Août 1969). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I. La présence d'alcaloïdes est confirmée par une extraction quantitative par un mélange ether-chloroforme (3-1) et avec un rendement = 7, 6%.

EXTRACTION

L'échantillon étudié a été récolté dans la forêt de Zombitse à 5 kilomètres au Nord de Sakaraha, sur la route Tananarive-Tuléar, au mois d'Août 1969, vraisemblablement une sous-espèce Xerophila.

Nous sommes partis de 2 kg d'écorces de racines préalablement réduites en poudre fine. Celle-ci est extraite par ether de pétrole pendant 16 heures après macération d'une nuit. Le marc séché, alcalinisé par ammoniac concentré (à pH = 8-9) est macéré par de l'ether pur (2 l.), à plusieurs reprises (6 fois). Les extraits étherés sont réunis et évaporés à sec : nous avons obtenu 40 g d'extrait.

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

A partir de 19 g de cet extrait, nous avons effectué une chromatographie sur colonne avec comme support = alumine activité I et comme éluant = benzène pur, benzène enrichi progressivement de différents pourcentages

O. R. S. I. O. M.

20 JUIL. 1970

Collection de Référence

n° B/4191

d'éthanol, éthanol pur, éthanol avec différents pourcentages de méthanol, et enfin méthanol pur. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux II.

Les différentes fractions obtenues (D,B,C,E) sont rechromatographiées séparément et les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux III, IV, V,VI.

### ETUDE DES CRISTAUX

Nous avons eu des cristaux :

- a) - dans les fractions 2-3-4-B ; ces cristaux (57 mg) récupérés sur filtre, lavés par hexane, benzène fondent à 277-280° et présentent une tache unique de  $R_f = 0,87$  sur CCM (support = kieselgel G - éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 7% méthanol - révélateur = réactif de Dragendorff (chromatogramme I).
- b) - dans la fraction 12 ; ces cristaux (13 mg) lavés par hexane, mélange hexane-benzène (2-1), présentent un point de fusion 234°, et une tache unique sur CCM (support = kieselgel G - éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 7% méthanol - révélateur = réactif de Dragendorff (chromatogramme II).
- c) - dans les fractions 2-3-4-C ; ces cristaux dont les points de fusion sont respectivement = 179° (pour 2C) 190° (pour 3-4 C) présentent deux taches de  $R_f = 0,1$  et 0,26.  
(support = kieselgel G - éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 7% MeOH - révélateur = réactif de Dragendorff) (chromatogramme III).
- d) - dans les fractions 5-6 C ; cristaux fondant à 186° (5C) et 195° (6C) avec trois taches de  $R_f = 0,1 - 0,26 - 0,4$  au CCM.  
(Chromatogramme III).

Ces cristaux qui se révèlent ainsi comme des mélanges de cristaux (2 ou 3 suivant le cas) font l'objet actuellement d'un essai de séparation par chromatographie préparative avec :

support = kieselgel FF

éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 7% MeOH (migration 2 fois)

révélateur = lumière U.V.

L'étude de cette plante se poursuit.

Tableau I

## TESTS PRELIMINAIRES

Numéro échantillon	DR	O	AL			Q	S	Fl	T	St	C	Observations
			M	D	ST							
1	6/68	F	+++	+++	+++	0	0	⊕	0	+	0	
		E.T.	+++	+++	+++	0	+	0	0	0	0	
		E.R.	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	
2	8/69	F	+++	+++	+++	0	0	0	0	⊕	0	
		E.T.	+++	+++	+++	0	0	0	0	+	0	
		E.R.	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	

DR = Date de récolte ; O = Organe utilisé ; (F = feuilles ; E.T. = écorce de tiges ; E.R. = écorce de racine)  
 AL = Alcaloïdes (M = réactif de Mayer ; D = réactif de Dragendorff ; ST = réactif silico-tungstique) ;  
 Q = quinone (réactif de Bornträger) ; S = saponine (indice de mousse) ; Fl = flavones (réaction de la cyanidine) ; T = Tanins (réactions avec perchlorure de Fer 5 % et gélatine salée) ; St = Stérols (réaction de Lieberman) ; C = cardénolides (réaction de Kedde).

Tableau II

Chromatographie sur colonne  
 19 g. d'alcaloïdes totaux  
 Support : alumine d'activité I

Numéros des fractions	Eluants	Poids	Observations
1 - 9 (A)	Benzène	708 mg.	
10 - 19 (D)	Benzène BZ 10% EoH	500 mg.	10-12-14-15 cristallisées
20 - 27 (B)	Benzène 10% EoH	8,417 g.	21 cristaux
28 - 29 - 30	Benzène 10% EoH	1,167 g.	cristaux
31 - 37 (C)	Benzène 10% éthanol Ethanol	7 g.	
38 - 52 (E)	Eau pure	890 mg.	

Tableau III

Chromatographie sur colonne  
des fractions 10-19 (D) poids : 500 mg.  
Support : alumine standardisée

Numéros des fractions	Eluants	Poids	Observations
1 - 5	Hexane	70 mg.	
6 - 7	Hexane 10% Bz	44 mg.	
8 - 12	Hexane 50% Bz	65 mg.	
13 - 14 - 15	Benzène pur	19 mg.	
16 - 20	Benzène 20% Ether	83 mg.	
21 - 24	Ether	76 mg.	
25 - 26	Ethanol pur	66 mg.	

Tableau IV

Chromatographie sur colonne  
des fractions 20-27 (8,417 g) (B)  
Support : alumine d'activité I

Numéros des fractions	Eluants	Poids	Observations
1 - 10	Benzène	873 mg.	Cristaux Fractions 1,2,3,4
11 - 17	Benzène + 10% éther	497 mg.	
18 - 31	Benzène + 50% éther	3,341 mg	
32-33-34	Ether	274 mg.	
35 - 36	Ether 25% EoH	213 mg.	Fraction 35 cristallisée
37 - 41	Ether 50% EoH	2,267 g.	
42 - 46	Ethanol pur	367 mg.	
47 - 51	Ethanol + 50% méthanol	338 mg.	
52 - 53	Methanol pur	65 mg.	
54 - 58	Eau pure	258 mg.	

Tableau V

Chromatographie sur colonne  
des fractions 31-37 (C) = (7 g)  
Support : alumine standardisée

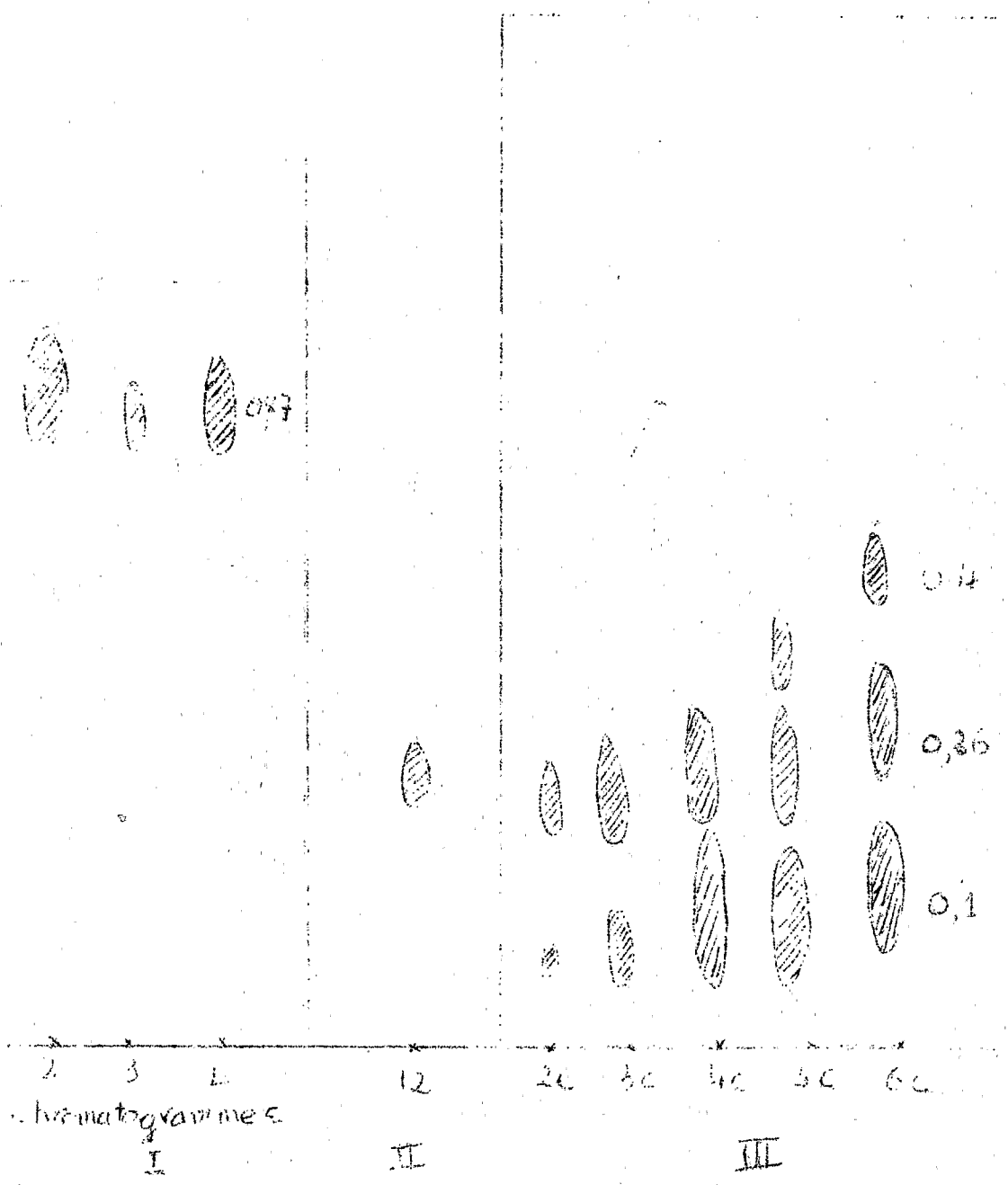
Numéros des fractions	Eluants	Poids	Observations
1 - 7	Benzène	2,498 g.	Fractions 2-3-4-5-6 cristaux
8 - 11	Benzène + 10% Ether	76 mg.	
12 - 13	Benzène + 30% éther	63 mg.	
14 - 15	Benzène + 50% éther	36 mg.	
16	Ether	12 mg.	
17 - 25	Ether 50 % EoH	2,396 g.	
26 - 31	Ethanol pur	321 mg.	
32 - 33	EoH 10% Methanol	63 mg.	
34 - 38	Ethanol 50% MeOH	134 mg.	
39 - 40	Methanol pur	13 mg.	
41 - 47	Eau pure	478 mg.	45 - 46 micro-cristaux



Tableau VI

Chromatographie sur colonne  
des fractions 38-50 poids 890 g (E)  
Support : alumine standardisée

Numéros des fractions	Eluants	Poids	Observations
1 - 5	Benzène	292 mg.	
6 - 7	Ether		
8 - 9 - 10	Ethanol pur	206 mg.	
11 - 12 - 13	Ethanol 50 % méthanol	107 mg.	
14 - 15 - 16	Méthanol pur	50 mg.	
17 - 21	Méthanol 50% Eau	116 mg.	



2 3 4  
 chromatogramme I

12  
 II

20 30 40 50  
 III

0,14  
 0,36  
 0,1

## ANNEXE II

### ETUDE CHIMIQUE DES ECORCES DE RACINES DU GELONIUM PYCNANTHERUM

#### Euphorbiacées

Arbuste à feuilles opposées, lancéolées, acuminées. Plante très connue dans le Sud-Ouest sous le nom vernaculaire de "HAZOMBALALA" (arbre des saute-relles), ses feuilles pilées sont utilisées, en emplâtre sur les plaies.

#### TESTS PRELIMINAIRES

Ces tests ont été effectués sur deux échantillons, l'un récolté en Avril 1968, l'autre en Août 1969, mais au même endroit (à environ trente kilomètres au Nord de Tuléar). Les résultats figurent au Tableau I.

Notons surtout la différence appréciable entre les rendements en alcaloïdes de deux échantillons.

#### EXTRACTION

Elle est faite sur l'échantillon récolté en Août 1969.

600 grs d'écorces de racines préalablement broyées sont extraites par l'éther de pétrole au Soxhlet.

Après quelques jours, l'extrait éthero-pétrolique laissé au repos à la température du laboratoire, dépose des cristaux. Ces derniers sont filtrés sur verre fritté, puis lavés au cyclohexane à chaud.

Ce sont des cristaux jaunâtres en fines aiguilles de  $PF = 208^\circ$ , donnant une coloration jaunâtre avec  $SO_4 H_2$ . La chromatographie sur plaque (CCM) avec support = gel de silice

éluant =  $CH_2 Cl_2$

révélateur = vanilline sulfurique (1%),

donne une belle tache violette à  $R_f = 0,56$  et une très légère coloration violette au point du dépôt (chromatogramme I).

D'autre part, la réaction de Lieberman (anhydride acétique + acide sulfurique) réalisée avec les cristaux donne une coloration mauve intense.

Après séchage du marc, ce dernier est alcalinisé par une solution d'ammoniaque au 1/2 (pH = 9) et 400 g. sont soumis à l'extraction par l'éther au soxhlet pendant 12 heures après macération d'une nuit. La solution étherée est évaporée à sec.

L'extrait ainsi obtenu est repris par eau acidulée (5% de HCl). On filtre et le filtrat clair est alcalinisé par de l'ammoniaque pur, on extrait ensuite à plusieurs reprises par l'éther, les différentes solutions étherées sont mélangées, évaporées à sec. L'extrait est chromatographié sur plaque avec support = Kieselgel G  
 éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + méthanol à différents pourcentages, mais le meilleur est à 3%  
 révélateur = réactif de Dragendorff (chromatogramme II).

La poudre séchée (338 g.) est ensuite extraite à acétate d'éthyle pendant 8 heures au soxhlet, après macération d'une nuit.

L'évaporation à sec de la solution obtenue permet d'obtenir des cristaux en aiguilles.

Le marc séché est repris par l'acétone au soxhlet pendant 16 heures, après macération d'une nuit. La solution acétonique évaporée donne un extrait repris par eau acidulée (5% HCl). On filtre, on extrait le filtrat par l'éther et le mélange de solutions étherées est évaporé à sec (extrait = 1,45 g.). On réalise un chromatogramme avec :

support = Kieselgel G  
 éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 3% MeOH  
 révélateur = réactif de Dragendorff (chromatogramme III).

L'extrait alcaloïdique total est chromatographié sur colonne avec alumine standard (activité II - III) et avec divers éluants : benzène pur - benzène + éther (10-50%) - éther pur - éthanol pur - méthanol pur.

Les résultats sont consignés dans le tableau II et la chromatographie des différentes fractions dans les chromatogrammes IV, V, VI, VII, VIII.

support = Kieselgel G  
 éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 3% MeOH  
 révélateur = réactif de Dragendorff.

Tableau I

TESTS PRELIMINAIRES

Numéro échantillon	DR	O	AL			Q	S	Fl	T	St	C	Observations
			M	D	ST							
1	27/4/68	F	+	+	+	0	1	0	0	0	0	Présence d'alcaloïdes confirmée par l'extraction Rendement = 2,6 %
		E.T.	++	++	+++	0	2	0	0	0	0	
		E.R.	++	++	+++	0	0	0	0	vert	0	
2	8/69	E.R.	++	++	++	0	0	0	0	0	0	Rendement alcaloïdes = 0,18 %

DR = Date de récolte ; O = Organe utilisé (F = feuilles ; E.T. = écorce de tige ; E.R. = écorce de racine) ;  
 AL = alcaloïdes (M = réactif de Mayer ; D = réactif de Dragendorff ; ST = réactif silico-tungstique) ;  
 Q = quinone (réaction de Bornträger) ; S = saponine (indice de mousse) ; Fl = flavones (réaction de la  
 cyanidine) ; T = tanins (réactions avec perchlorure de Fer 5 % et gélatine salée) ; St = stérols (réaction  
 de Lieberman) ; C = cardénolides (réaction de Kedde).

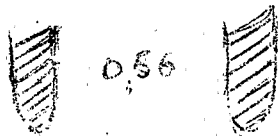
Tableau II

Chromatographie sur colonne

Gélonium 1,495 g.

Support : alumine standardisée

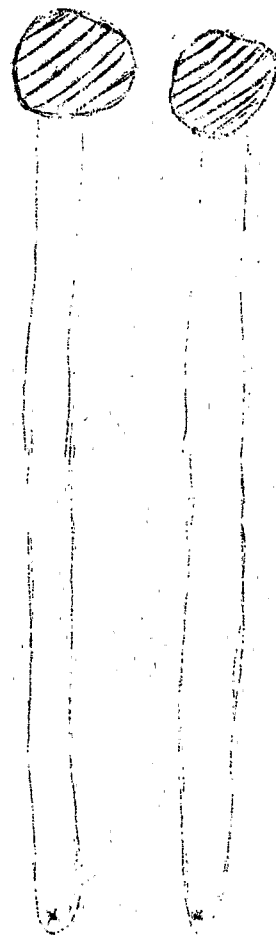
Numéros des fractions	Eluants	Poids	Observations
1 - 3	Benzène	68 mg.	1 tache au C.C.M. Rf : 0,93
5 - 6	Benzène	185 mg.	2 taches au C.C.M. Rf : 0,94 ; 0,82
7	Benzène	30 mg.	1 tache au C.C.M. Rf : 0,96
8 - 12	Benzène	98 mg.	2 taches au C.C.M. Rf : 0,96 ; 0,94
13 - 14	Benzène	15 mg.	3 taches au C.C.M. Rf : 0,96; 0,94; 0,75
16 - 19	Benzène + 10% Ether	40 mg.	1 tache principale au C.C.M. Rf : 0,77
20 - 24	Benzène + 10% Ether	40 mg.	1 tache principale au C.C.M. Rf : 0,92
25 - 27	Benzène 50 % Ether	58 mg.	2 taches au C.C.M. Rf : 0,84 ; 0,72
28 - 31	Benzène 50 % Ether	212 mg.	1 tache principale au C.C.M. Rf : 0,72
32 - 45	Benzène 50% Ether Ether pur	112 mg.	traînée
46 - 54	Ethanol pur Methanol pur	132 mg.	tache au dépôt



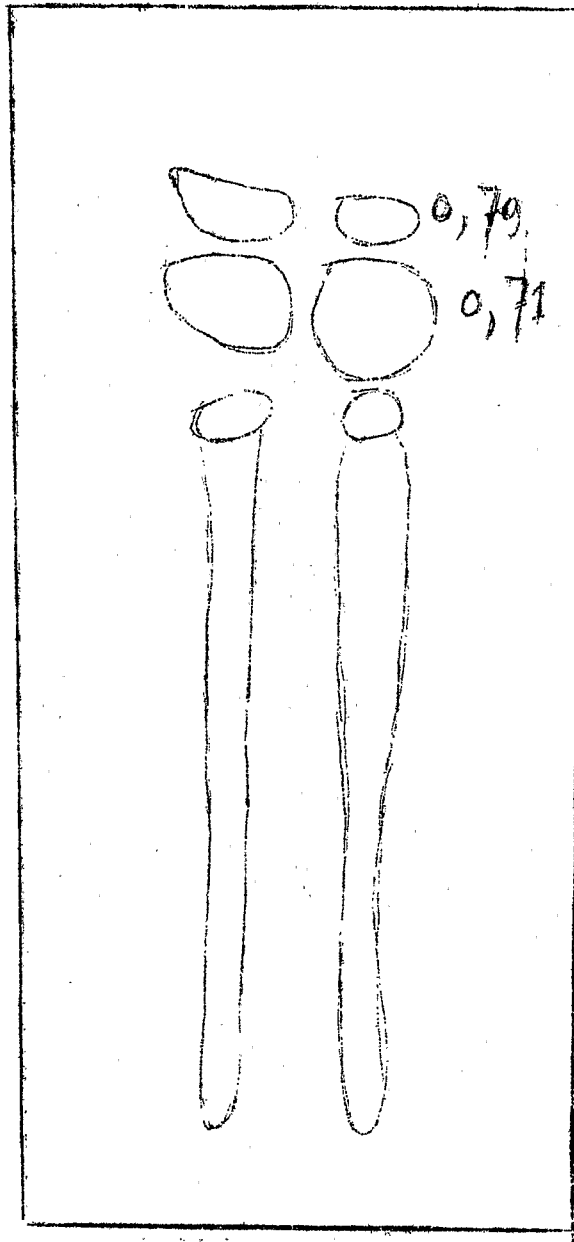
x

x

Chromatogramme I

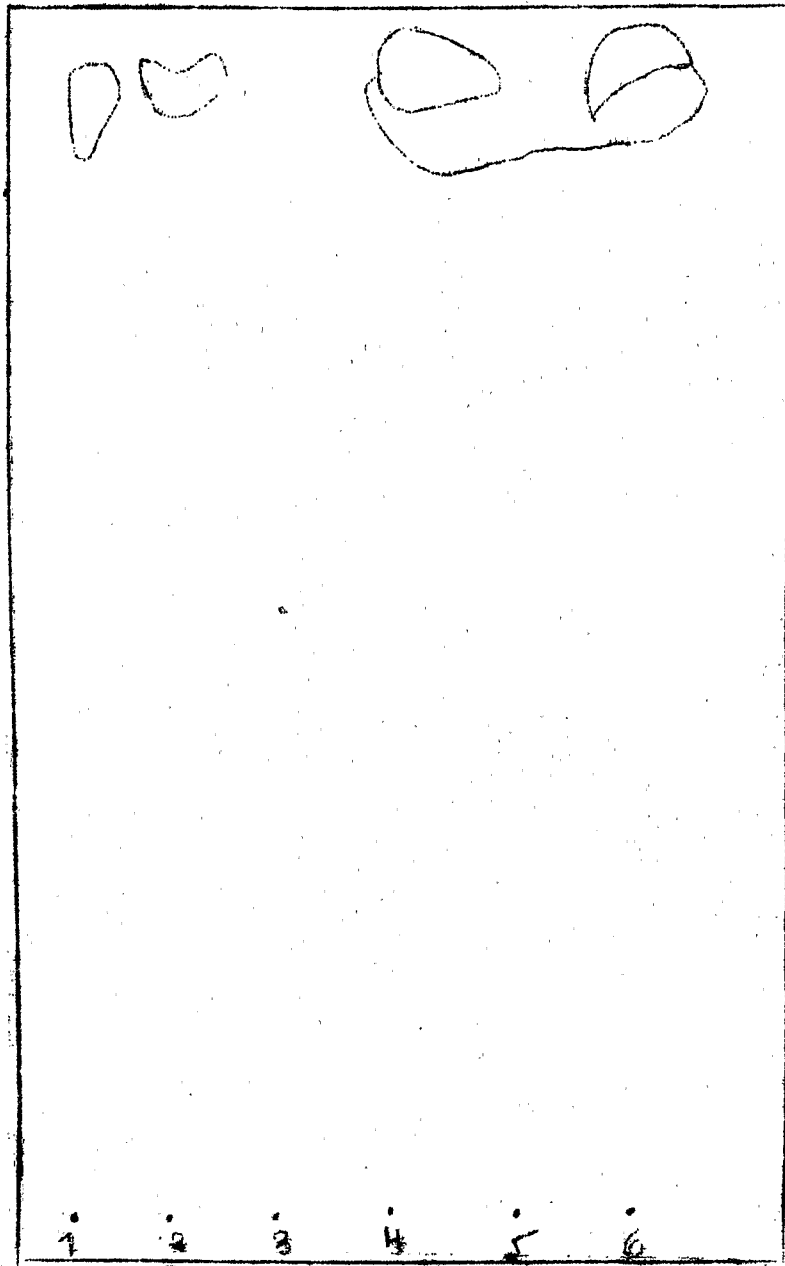


Chromatogramme II



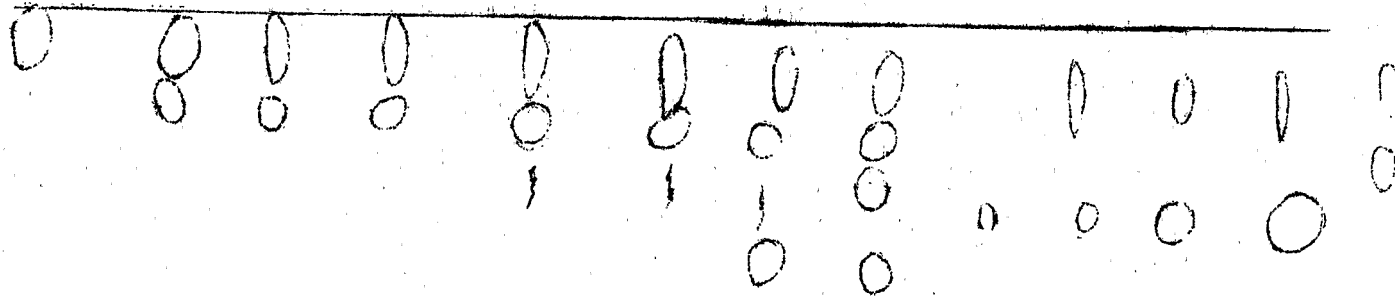
Chromatogramme III





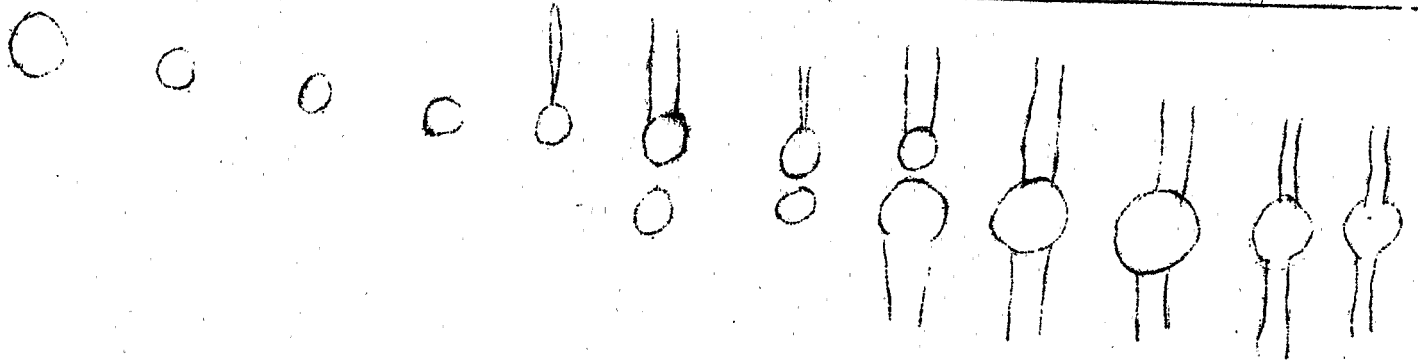
Chromatogramme IV

Chromatogramme V



7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

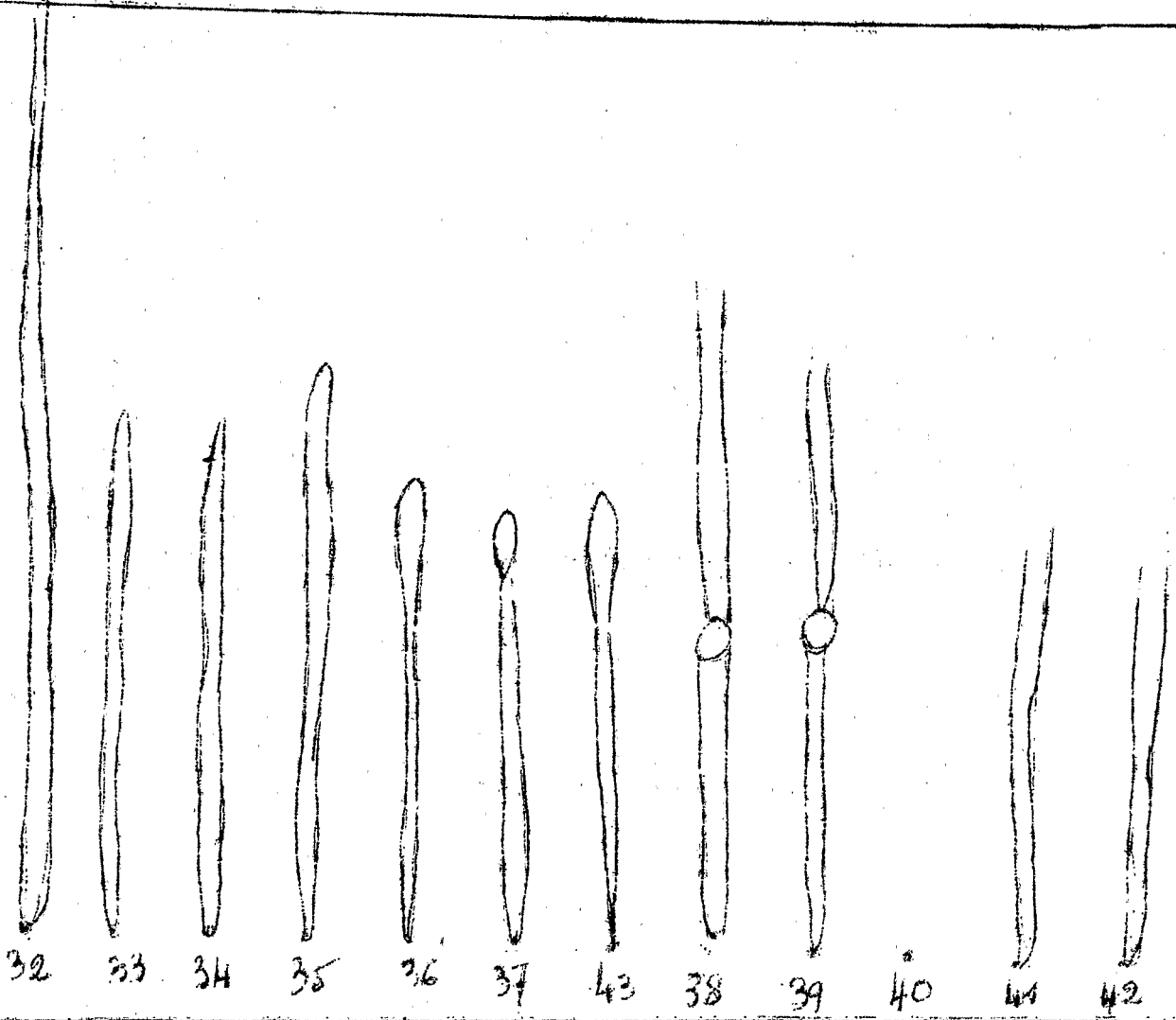
Chromatogramme V



20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31

Chromatogramma VI

Chromosomeogram VII



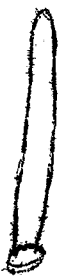
# Chromatogramme VIII

1  
2  
3

4  
5  
6



44



45



46



47



48



49



50



51



52



53



55



54

### ANNEXE III

#### ETUDE CHIMIQUE DES ECORCES DES RACINES DE TECLEA

##### Rutacées

C'est un arbuste toujours vert, glabre, à feuilles alternes, trifoliciées, connu sous le nom vernaculaire "AMPOLY" et qui serait un vermifuge puissant, d'après l'indication du "guérisseur".

##### TESTS PRELIMINAIRES

Réalisés sur deux échantillons récoltés au même endroit (forêt de Zombitse, au Nord de Sakaraha). Résultats dans le tableau I.

##### EXTRACTION

Elle est réalisée sur l'échantillon n° 2 ; vraisemblablement, c'est le TECLEA BOIVINIANA (Baill.) H. Perr.

Les écorces des racines, réduites en poudre fine (500 g.) sont extraites au soxhlet, par l'éther de pétrole. La solution éthéro-pétrolique évaporée à sec, donne un résidu (poids = 11,74 g.).

Le marc séché, alcalinisé par l'ammoniaque est soumis à l'extraction par l'éther après macération d'une nuit. La solution éthérée est évaporée ; le résidu obtenu est repris par eau acidulée, laquelle est extraite par l'éther à plusieurs reprises jusqu'à réaction négative au réactif de Mayer. Le mélange des solutions éthérées est évaporé à sec, et on a l'extrait total d'alcaloïdes (poids = 1,88 g.). On réalise une chromatographie sur CM de cet extrait avec support = Kieselgel G  
éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 3% MeOH (meilleur résultat obtenu avec ce pourcentage)  
révélateur = réactif de Dragendorff (Chromatogramme I).

D'autre part, on a effectué une chromatographie sur colonne de cet extrait avec alumine standardisée (activité II - III).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau II.

Les fractions obtenues sont chromatographiées sur CCM avec :  
support = Kieselgel G  
éluant =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 3% MeOH  
révélateur = réactif de Dragendorff (Chromatogrammes II - III).

Tableau I

TESTS PRELIMINAIRES

Numéro échantillon	DR	O	AL			Q	S	Fl	T	St	C	Observations
			M	D	ST							
1	5/68	F	+++	+++	+++	0	0	orange	0	0	0	présence d'alcaloïdes confirmée par l'extraction ether-chloroforme (3-1) rendement = 3 %
		E.T.	+++	+++	+++	0	0	orange	0	0	0	
		E.R.	+++	+++	+++	0	0	orange	0	0	0	
2	8/69	E.R.	++	++	++	0	0	0	+	0	0	

DR = Date de récolte ; O = Organe utilisé (F = feuilles ; E.T. = écorce de tige ; E.R. = écorce de racines ; AL = Alcaloïdes (M = réactif de Mayer ; D = réactif de Dragendorff ; ST = réactif silico-tungstique) ; Q = quinone (réactif de Bornträger) ; S = saponine (indice de mousse) ; Fl = flavones (réaction de la cyanidine) ; T = tanins (réactions avec perchlorure de Fer 5 % et gélatine salée) ; St = stérols (réaction de Lieberman) ; C = cardénolides (réaction de Kedde).

Tableau II

Chromatographie sur colonne

Teclea

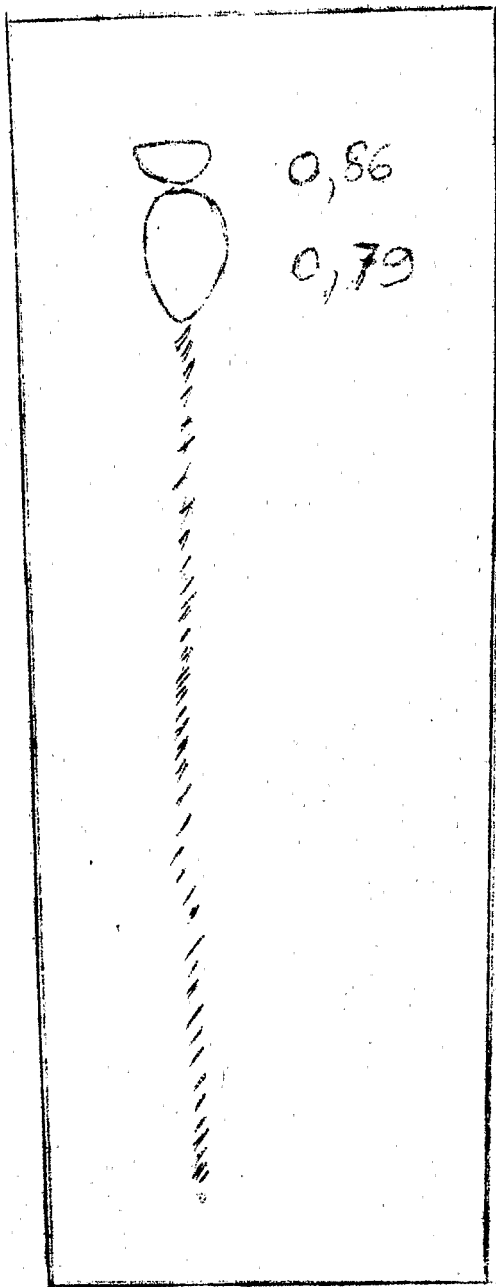
Support : alumine standardisée

Numéros des fractions	Eluants	Poids	Observations
1 - 2	Benzène	6 mg.	2 taches au C.C.M. Rf : 0,87 ; 0,94
3	Benzène	5 mg.	1 tache au C.C.M. Rf. : 0,87
6 - 11	Benzène 10 % éther Benzène 50 % éther	40 mg.	2 taches au C.C.M. Rf : 0,87 ; 0,78
12 - 13	Benzène 50 % éther	30 mg.	2 taches au C.C.M. Rf : 0,78 ; 0,70
14 - 15	Benzène 50 % éther	10 mg.	3 taches au C.C.M. Rf : 0,80;0,78;0,70
16	Ether pur	5 mg.	2 taches au C.C.M. Rf : 0,70 ; 0,54
17 - 21	Ether pur	753 mg.	Taches indistinctes
22 - 29	Ethanol pur	250 mg.	taches au dépôt



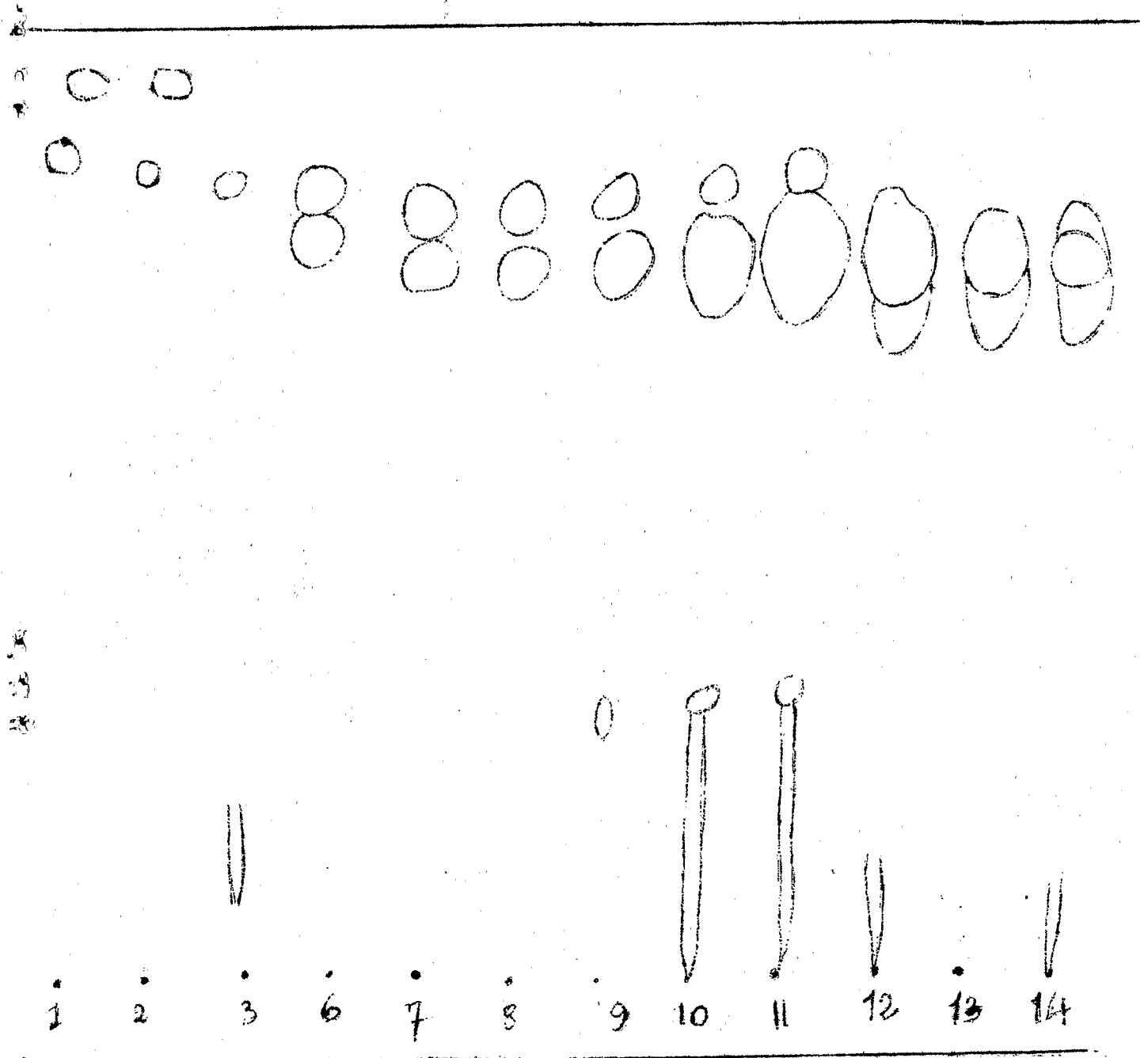
11.2.85

第 1 次

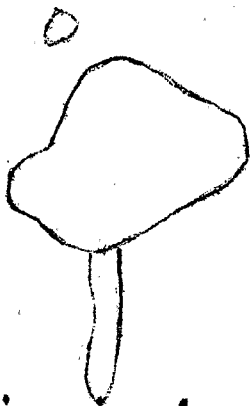
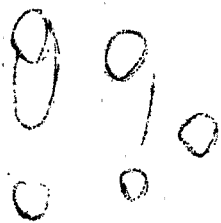


Chromatogramme I

# Chromatogramme II



# Chromatogramme III



15 16 17 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29