

**ÉTUDE CHIMIQUE DES FEUILLES
DE *BYRSONIMA VERBASCIFOLIA* RICH. ex JUSS.**

par Ch. DOSSEH (*), Ch. MORETTI (**), A. M. TESSIER (*)
et P. DELAVEAU (*)

ABSTRACT

Gallic tanins and saponins are present. Hydrocarbons specially eicosane and heneicosane, α -amyrin, oleanolic and ursolic acids, quercetin, isoquercitrin and quercetin-3-arabinosyl are isolated.

INTRODUCTION

Le *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex Juss. (Malpighiacées) est un arbuste d'Amérique du Sud de 2 à 3 m de hauteur. Feuilles et écorces de racine sont utilisés pour le traitement de diverses dermatoses en médecine traditionnelle guyanaise. Déjà l'écorce de racine a été l'objet de recherches biochimiques portant sur les constituants triterpéniques et stéroïdiques [1].

Des propriétés immunostimulantes de la macrophagie ont été observées à partir de la fraction liposoluble de cette écorce [2].

Le présent travail a trait à l'étude chimique des feuilles.

RÉSULTATS

Un triage préliminaire, selon les méthodes habituelles [3] met en évidence la présence de triterpènes et de stérols, de flavonoïdes et de tanins galliques, de saponosides avec un indice de mousse de 160 [4]. La teneur en flavonoïdes, mesurée par référence au rutoside, est de 0,45 g pour 100 g de feuilles sèches et la teneur en tanins est de 6,5 g. L'abondance de ces derniers gêne considérablement l'isolement des flavonoïdes [5, 6].

HYDROCARBURES.

Les premières fractions de la chromatographie sur colonne de l'extrait

(*) Laboratoire de Matière Médicale, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris V, France.

(**) Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer, Centre de Cayenne, Guyane.

Key word Index. — *Byrsonima verbascifolia*, Malpighiacées ; hydrocarbures ; triterpènes ; flavonoïdes.

3- OCT. 1984

— 136 — O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 15825, ex 1 M

Cote : B

chloroformique contiennent de nombreux hydrocarbures ne donnant qu'une seule tache de Rf 1 environ avec les solvants apolaires usuels. Le mélange des hydrocarbures fournit un spectre IR avec des bandes à 3.080, 2.960, 2.920, 2.860, 1.645, 1.470, 1.445, 1.385, 1.380, 1.310, 1.000, 920, 735 et 725 cm^{-1} .

La CPG-SM permet d'individualiser une dizaine de pics de masses respectives : 282, 296, 338, 352, 368, 382, 392, 410, 436. Les deux premiers sont attribués sans ambiguïté à l'écicosane ($\text{C}_{20}\text{H}_{42}$) et à l'hénécicosane ($\text{C}_{21}\text{H}_{44}$).

TRITERPÈNES.

A partir des fractions ultérieures de la colonne, ont été obtenus trois triterpènes A, B et C fournissant la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD.

Triterpène A :

PF 187 °C.

En CCM de silice, on obtient une tache de Rf 0,50 (S_1), 0,65 (S_2) et 0,70 (S_3). Valeurs compatibles avec celles de l' α - et de la β -amyrine.

On peut avancer que A appartient à la série 12-ursène d'après les bandes IR à 1.390, 1.380 et 1.360 cm^{-1} (CH_3) et à 1.640 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$) [7] et d'après l'intensité relative des pics de fragmentation du SM à 218 ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}$: 100 %) et 203 ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}$: 36 %) [8]. En outre le spectre RMN présente un massif centré à 5,1 ppm, caractérisant un proton oléfinique. Il s'agit d'un triterpène monohydroxylé, le spectre IR présentant une bande à 3.320 cm^{-1} (OH) et la RMN montrant un pic à 8,42 ppm (H, s, OH) ainsi qu'un massif centré à 3,35 ppm (H, m, C_3 -H) attribuable au proton fixé sur le carbone portant l'OH alcoolique [9]. D'autre part, la SM montre un pic moléculaire à 426 suivi d'un pic à 393 dû à la perte d'un H_2O et d'un CH_3 [8] et d'un pic à 207 ($\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}$: 21 %).

L'ensemble des résultats spectrométriques permet de conclure à l' α -amyrine.

Triterpène B :

PF 300 °C.

En CCM de silice on obtient une tache de Rf 0,15 (S_1), 0,40 (S_3), 0,40 (S_4) ; en CCM de silice imprégnée de décaline, le Rf est 0,80 (S_5).

On peut avancer que B appartient soit à la série 12-ursène soit à celle du 12-oléanène : Δ^{12-13} ; IR : 1.640 cm^{-1} ; RMN : 5,32 ppm (H, s, proton oléfinique) ; SM : pics de fragmentation caractéristiques du mécanisme de « Retro-Diels-Alder » sur la double liaison en 12-13 : 248 ($\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$: 100 %), 207 ($\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}$: 19 %), 203 ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}$: 72 %), 189 ($\text{C}_{14}\text{H}_{21}$: 19 %) et 133 ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}$: 14 %). Cependant l'intensité des pics est en faveur de la série 12-oléanène.

Il s'agit d'un triterpène monohydroxylé : IR 3.340 cm^{-1} ; SM : 456 (M^+), 438 ($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$) ; RMN : 8,55 ppm (H, s, OH) et un massif centré à 3,25 ppm (H, m, C_3 -H).

La présence d'une fonction carboxylique en 17 est prouvée par la bande

à 1.700 cm^{-1} en IR, les pics de fragmentation à 410 ($M^+ - \text{HCOOH}$) et à 203. Ces données permettent d'identifier B à l'acide oléanolique.

Triterpène C :

PF $280\text{ }^\circ\text{C}$.

En CCM de silice on obtient une tache de R_f 0,15 (S_1), 0,35 (S_4), et 0,50 (S_3). En CCM de silice imprégnée de décaline R_f : 0,50 traînée (S_5).

On peut avancer que C est du type 12-ursène ou 12-oléanène : IR : 1.640 cm^{-1} , RMN : 5,4 ppm (H, s, proton oléfinique), SM : mêmes pics que pour B, avec des intensités différentes.

C'est un triterpène monohydroxylé : IR : 3.340 cm^{-1} , SM : 456 (M^+), 438 ($M^+ - \text{H}_2\text{O}$), RMN : 8,55 ppm (H, s, OH), 3,35 ppm (H, m, $C_3\text{-H}$).

Il porte une fonction acide : IR : 1.700 cm^{-1} , SM : 410 et 203.

Ces données permettent d'identifier le composé C à l'acide ursolique.

FLAVONOÏDES.

Le mode d'extraction choisi s'est montré plus efficace que les méthodes habituelles.

Par CCM bidimensionnelle sur cellulose (solvant S_9 puis S_7), on observe la présence de six flavonoïdes différents dont trois d'entre eux seulement ont pu être isolés.

GÉNINE LIBRE.

Par les méthodes classiques (réaction de la cyanidine, CCM, spectrométrie UV), cette génine est identifiée au quercétol.

HÉTÉROSIDE F_1 .

La réaction dite de la cyanidine fournit une coloration rouge. Les R_f en CCM de cellulose sont de 0,25, 0,62 et 0,61 respectivement pour les solvants S_7 , S_9 et S_{10} . Les colorations des taches de CCM et les fluorescences à 365 nm obtenues après pulvérisation avec les réactifs habituels, les pics d'absorption de l'hétéroside et ceux de la génine obtenue après hydrolyse

TABLEAU I
Spectre UV de F_1 et F_2

max	F_1		F_2	
	Bande I	Bande II	Bande I	Bande II
MeOH	360	257	362	258
AlCl_3	440	276	438	276
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	408	270	405	270
Acétate de Na	384	274	385	274
Acétate de Na + acide borique	380	263	382	262
Méthylate de Na	394	274	400	274

acide (Tableau I) permettent d'identifier celle-ci au quercétol. L'hydroxyle en position 3 est bloqué par une molécule d'arabinose caractérisé en CCM de silice (solvant S₁₁ et S₁₂).

HÉTÉROSIDE F₂.

Il est identifié à l'isoquercitroside (Mg + HCl : rouge ; CCM cellulose Rf 0,35 (S₇) ; 0,60 (S₉) ; 0,66 (S₁₀) ; données spectrales pour la génine (Tableau I) ; glucose caractérisé après hydrolyse par la β-glucosidase en CCM de silice ; fluorescence brun mat de l'hétéroside à 365 nm).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATÉRIEL.

Récolté par l'un de nous en 1976 à Tonate (Guyane).

POINTS DE FUSION.

(Pf non corrigés) Appareil TOTTOLI.

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM).

— Support.

Silice ; Schleicher et Schüll F 1.500.

Silice imprégnée d'une solution de décaline à 10 % dans l'éther de pétrole. Séchage 4 h à température ambiante.

Cellulose : Schleicher et Schüll F 1.440.

— Solvants de migration.

S ₁ hexane-éther 50 : 50 V/V	}	triterpènes
S ₂ hexane-éther 20 : 80 V/V		
S ₃ CHCl ₃ -MeOH 97 : 3 V/V		
S ₄ Toluène-CHCl ₃ -MeOH 30 : 15 : 5 V/V		
S ₅ MeOH-H ₂ O 90 : 10 V/V		
S ₆ CHCl ₃ -MeOH 60 : 40 V/V	}	flavonoïdes
S ₇ AcOH-H ₂ O 15 : 85 V/V		
S ₈ AcOH-H ₂ O 50 : 50 V/V		
S ₉ BuOH-AcOH-H ₂ O 4 : 1 : 5 V/V	}	oses
S ₁₀ BuOH-IsoproOH-H ₂ O 5 : 3 : 1 V/V		
S ₁₁ BuOH-IsoproOH-H ₂ O 5 : 3 : 0,5 V/V		

— Réactifs.

R ₁ acide sulfurique à 20 %	hydrocarbures
R ₂ réactif au SbCl ₃	triterpènes
R ₃ réactif au AlCl ₃	} flavonoïdes
R ₄ réactif à l'acétate de plomb	
R ₅ réactif au phtalate d'aniline	oses

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

Kieselgel G 60, 35-70 Mesh.

SPECTRE UV.

Appareil UNICAM SP 800.

IR.

Appareil BECKMANN 4250 (KBr).

CPG-SM.

Appareil GIRDEL, colonne capillaire 25 m avec injecteur de Ros, phase SE 30, gaz vecteur : hélium split 20 ml/mn, température : injecteur 280 °C, colonne 200 à 280 °C/mn, transfert : 290 °C.

Appareil de Masse RIBER 400. Energie des électrons 70 eV, impact électronique, pression résiduelle $3 \cdot 10^6$ Torr.

SM.

Appareil SM 50 AEI.

RMN.

Spectromètre BRUCKER 80 MHz, solvant : pyridine deutériée.

EXTRACTION : MÉTHODES.

— *Extrait chloroformique.*

Les feuilles sèches (1,3 kg) réduites en poudre sont épuisées par lixiviation au chloroforme à froid. Par distillation de ce solvant on recueille 75 g d'une

TABLEAU II

Marche de la chromatographie sur colonne de silice.

Eluant	Nombre de fractions de 500 ml versés	Poids brut (en g) de résidu obtenu	N° de la fraction	Produits séparés
Hexane	1	0,34	F ₁	Hydrocarbures Terpènes
Hexane	3	0,82	F ₂	
Hexane-éther 99 : 1 V/V ...	4	0,28	F ₃	} Mélange de ter- pènes et de Caroténoïdes (poids total : 3,87 g)
Hexane-éther 98 : 2 V/V ...	2	0,57	F ₄	
Hexane-éther 97 : 3 V/V ...	1	0,127	F ₅	
	1	0,06	F ₆	
Hexane-éther 96 : 4 V/V ...	3	0,07	F ₇	
Hexane-éther 90 : 10 V/V ..	3	1,78	F ₈	
Hexane-chloroforme 50 : 50 V/V	3	0,90	F ₉	
Hexane-CHCl ₃ 20 : 80	3	3,61	F ₁₀	
	3	1,16	F ₁₁	Chlorophylle
CHCl ₃	2	0,70	F ₁₂	
CHCl ₃ -MeOH 99 : 1	2	10	F ₁₃	} Mélange de ter- pènes (poids total : 11,86 g)
98 : 2	2		F ₁₄	
97 : 3	2		F ₁₅	

masse pulvérulente verte, qui, traitée par le méthanol à chaud, donne un extrait sec débarrassé de la plupart des pigments (32 g). Cet extrait est fractionné sur colonne de silice (G Kieselgel 35-70 Mesh, 256 g) avec des solvants d'éluion de polarité croissante (Tableau II).

A a été ensuite purifié par CCM préparative de silice Schleicher et Schüll, solvant S₁ ; B et C l'ont été par CCM préparative de la même silice préalablement imprégnée d'une solution de décaline à 10 % dans l'éther de pétrole (35-40 °C), solvant S₅.

— *Extrait aqueux.*

La poudre de feuilles de *B. verbascifolia* Rich. ex Juss. (2,3 kg) est traitée par l'eau bouillante (40 l). La solution aqueuse filtrée est concentrée à 5 l. L'extrait obtenu est opposé à de l'acétate d'éthyle (5 l × 5). Le résidu provenant de la concentration de l'acétate d'éthyle (40 g) est fractionné sur une colonne de Kieselgel G 60 (Tableau III). Les flavonoïdes majoritaires F₁,

TABLEAU III

Marche de la chromatographie sur colonne de silice des flavonoïdes

Eluant	Nombre de fractions de 1 l versées	Poids en g du résidu d'évaporation	N° de la fraction	Produits séparés
CH ₂ Cl ₂	14	0,04	F ₁	} Terpènes
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 99,5 : 0,5 V/V	5	0,03	F ₂	
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 99 : 1 V/V ..	15	0,20	F ₃	
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 98,5 : 1,5 V/V	2	0,06	F ₄	} Mélange de tannins, flavonoïdes et dérivés galliques
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 98 : 2 V/V ..	2	0,75	F ₅	
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 97 : 3 V/V ..	2	0,80	F ₆	
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 95 : 5 V/V ..	8	4,57	F ₇	
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 92 : 8 V/V ..	5	2,80	F ₈	} Tanins
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 90 : 10 V/V ..	5	11,80	F ₉	
CH ₂ Cl ₂ -MeOH 80 : 20 V/V ..	10	10	F ₁₀	

et F₂ ont été purifiés par CCM préparative de silice (solvant : S₆). Une seconde CCM préparative de cellulose (solvant : S₇) permet d'obtenir les 2 flavonoïdes I (26 mg) et II (14 mg) à l'état pur.

HYDROLYSE ACIDE DES FLAVONOÏDES [10].

Réalisée en présence de H₂SO₄ 1 N 4 h à 100 °C, la génine est extraite par l'éther.

HYDROLYSE ENZYMATIQUE.

1 à 2 mg d'hétéroside en solution dans 5 ml d'eau sont laissés en contact avec 5 à 10 mg de β-glucosidase (N° G 8625-Sigma) une nuit à 37 °C sous toluène.

La solution est décantée pour éliminer le toluène, filtrée et épuisée par l'éther éthylique.

CHROMATOGRAPHIE DES OSES.

Réalisée sur la phase aqueuse des produits d'hydrolyse.

Support : CCM silice, solvant S₁₁ et S₁₂.

Révéléateur S₅. Etalons : solutions d'oses 1 % dans la pyridine.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les travaux antérieurs réalisés par GOTTLIEB *et al.* [1] sur l'écorce de racine, ont mis en évidence la présence de stérols (β -sitostérol) ; de terpènes de la série oléanane : β -amyrine (97 %) β -amyrénone, friedeline, acide acétyl-oléanolique, sous forme de traces et de la série ursane : glochidone et acétate de lupéol. Cette composition n'a pas été retrouvée dans les feuilles qui contiennent en revanche α -amyrine, acide ursolique et acide oléanolique en quantité assez importante. Peut-être les autres triterpènes décrits dans les racines figurent-ils sous forme de traces dans les feuilles ?

La teneur élevée en tanins galliques (6,5 g %) gêne l'extraction des flavonoïdes dont la concentration est assez faible (0,45 %). Si l'isoquercitroside est un flavonoïde très banal, l'arabinosyl-3 quercétol isolé se rattache à un type d'hétérosides plus rare. RABATE et DUSSY avaient décrit pour la première fois un L-arabinosyl-3 quercétol du *Polygonum polystachyum* Wall. ex Meissn. Le L-arabinosyl-3 quercétol est isolé du *P. aviculare* L par OHTA [11] sous le nom d'avicularine. Ce même auteur décrit un arabinosyl-3 quercétol du *Foeniculum vulgare* Mill. (fœniculine) [12]. Le L-arabinosyl-3 quercétol a été isolé du *Psidium guajava* L par EL KHADAM et MOHAMED (guajavérine) [13]. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un arabinosyl quercétol est trouvé dans une Malpighiacée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GOTTLIEB (O. R.), MENDES (P. H.), et MAGALHAES (M. T.). — *Phytochemistry*, 1975, **14**, 1456.
- [2] DELAVEAU (P.), LALLOUETTE (P.) et TESSIER (A. M.). — *Planta medica*, 1980, **40**, 49.
- [3] BOUQUET (A.). — Travaux et documents de l'O. R. S. T. O. M. Plantes médicinales du Congo Brazzaville, 1972, **13**, 8.
- [4] Pharmacopée française IX^e édition, 2^e partie, chapitres et renseignements divers, 1976.
- [5] DURET (S.) et PARIS (R. R.). — *Pl. méd. et Phytothér.*, 1970, **4**, 159.
- [6] PARIS (R. R.) et NOTHIS (A.). — *Pl. méd. et Phytothér.*, 1970, **4**, 63.
- [7] SNATZKE (G.), LAMPERT (F.) et TSCHESCHE (R.). — *Tetrahedron Letters*, 1962, **18**, 1417.
- [8] BUDZIKIEWICZ (H.), DJERASSI (C.) et WILLIAMS (D. H.). — Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. Steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous classes. Holden Day Inc. San Francisco, London, Amsterdam, 1964, **2**, 110.
- [9] LABLACHE-COMBIER (A.), LEVISALLES (J.), PETIE (J. P.) et RUDLER (H.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1963, 1689.
- [10] HARBORNE (J. B.). — *Phytochemistry*, 1965, **4**, 107.
- [11] OHTA (T.). — *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1940, **263**, 221.
- [12] OHTA (T.) et MIYAZAKI (M. J.). — *Pharm. Soc. Japan*, 1955, **79**, 986.
- [13] EL KHADAM (H.) et MOHAMED (Y. S.). — *J. Chem. Soc.*, 1958, 3320.