

UN NOUVEAU SAPONOSIDE DE *BERSAMA YANGAMBIENSIS*

M. VANHAELEN

Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles, Belgique

(Reçu le 23 avril 1971, révisé 3 septembre 1971)

Résumé—La structure d'un nouveau saponoside, extrait de *Bersama yangambiensis*, est déterminée, principalement, par spectrométries de RMN et de masse du dérivé perméthylé. La sapogénine, identifiée à l'acide oléanolique, est substituée d'une part, en position 3β , par une chaîne constituée du β -D-glucuronopyranosyl ($4 \rightarrow 1$) O - β -D-glucopyranosyl ($4 \rightarrow 1$) O - β -D-xylopyranosyl ($4 \rightarrow 1$) O - β -L-arabinopyranose, et, d'autre part, en position 28, par une molécule de β -D-glucopyranose. Le saponoside, quoique complexe, est aisément identifié suivant les méthodes proposées qui constituent un mode d'analyse de choix pour l'identification et l'étude de la structure d'un saponoside.

Abstract—The structure of a new saponin extracted from *Bersama yangambiensis* was determined by NMR and mass spectrometry of the permethylated derivative. The sapogenin, identified as oleanolic acid, is linked in position 3β to a chain composed of β -D-glucuronopyranosyl ($4 \rightarrow 1$)- O - β -D-glucopyranosyl ($4 \rightarrow 1$) O - β -D-xylopyranosyl ($4 \rightarrow 1$) O - β -L-arabinopyranose, and in position 28 by one molecule of β -D-glucopyranose. The saponin, although complex, is easily identified by the proposed methods which constitute a good method for the identification and the structural elucidation of a saponin.

INTRODUCTION

LES EXTRAITS totaux d'écorces de *Bersama yangambiensis* Toussaint¹ Méliantheae (Yan-gambi, République Démocratique du Congo), moussent abondamment par agitation avec l'eau et manifestent un pouvoir hémolytique et ichtyotoxique marqué. La technique de révélation spécifique² utilisant, après chromatographie sur couche mince des extraits, le recouvrement des chromatoplaques par de la gélatine au sang, précise la présence d'un ou plusieurs saponosides.

RESULTATS ET DISCUSSION

Structure de la Sapogénine

L'hydrolyse du saponoside fournit une sapogénine acide de nature triterpénique (réaction de Brieskorn et Mahran).³ Elle est identifiée à l'acide oléanolique; la comparaison est opérée à l'aide des spectres IR, de RMN et de masse, de la mesure du pouvoir rotatoire et par chromatographie sur couche mince en présence d'un échantillon authentique d'acide oléanolique.

Structure du Saponoside

Identification des oses. L'analyse chromatographique sur papier de la solution aqueuse d'hydrolyse du saponoside met en évidence du glucose, de l'arabinose, du xylose et de l'acide glucuronique. L'intensité de la coloration du spot de glucose paraît approximativement double de celle des autres spots. La chromatographie en phase gazeuse de la

¹ J. TOUSSAINT, *Bull. Jard. Bot. Etat Brux.*, **29**, 69 (1959).

² E. STAHL, *Thin-Layer Chromatography* (2nd Edition), p. 246, Springer Verlag (1969).

³ C. H. BRIESKORN et G. H. MAHRAN, *Naturwissenschaften* **47**, 107 (1960).

même solution, après silylation, confirme d'une part ces premiers résultats qualitatifs et d'autre part l'existence de deux molécules de glucose pour une molécule de xylose, d'arabinose et d'acide glucuronique. La réaction de Tollens, positive, présentée par le saponoside implique la présence d'un acide uronique dans la molécule; il ne s'agit donc pas d'un artefact apparu lors des diverses manipulations précédant la chromatographie.

Etude de la Séquence des Dérivés Osidiques et de Leur Liaison avec la Sapogénine

C'est principalement l'analyse du saponoside perméthylé qui permet d'en faire l'approche. Après hydrolyse du saponoside perméthylé, la chromatographie des oses partiellement méthylés, selon la méthode de Hirst *et al.*,⁴ conduit, suivant leur valeur R_G respectives et à la lumière des premiers résultats obtenus, à l'identification: (a) du tri *o*-méthyl-2,3,6 glucose, $R_G \approx 0,81$; (b) du di *o*-méthyl-2,3 xylose, $R_G \approx 0,74$; (c) du tri *o*-méthyl-2,3,4 arabinose et du tétra *o*-méthyl-2,3,4,6 glucose $R_G \approx 0,95$ à 1,00; (d) d'un acide uronique partiellement méthylé, $R_G \approx 0,09$, à fonction acide libre (hydrolyse probable de l'ester méthylique au cours des manipulations d'isolement).

Ces spots, révélables par le phthalate d'aniline ou par le chlorure de triphényltétrazolium, ne le sont pas par le système acide périodique-benzidine. La chaîne des oses serait donc linéaire et non ramifiée. Une deuxième hypothèse qui se dégage de cette analyse, résulte du fait que deux des oses, l'arabinose et l'une des molécules de glucose, se trouveraient fixées en fin de chaîne; ceci ne peut se concevoir qu'en substituant l'acide oléanolique à la fois sur sa fonction acide et sur sa fonction hydroxyle en position 3.

A ce stade, les formules brutes du saponoside $C_{58}H_{92}O_{27}$, $M = 1220$ et du saponoside perméthylé $C_{73}H_{122}O_{27}$, $M = 1430$, $15-OCH_3$, peuvent être avancées sans que l'ordre réel de la séquence des oses n'intervienne dans leur établissement. Les valeurs analytiques calculées pour le saponoside (C, 57,05; H, 7,54; O, 35,40 %) sont en bonne concordance avec celles trouvées (C, 58,03; H, 7,87; O, 34,05 %). La détermination des méthoxyles fixés sur la saponoside perméthylé, selon la méthode de Zeisel, appuie nettement l'hypothèse de $15-OCH_3$ (% OCH_3 calculé; 32,51. % OCH_3 trouvé, 32,05 %). Le nombre de $-OCH_3$ est également confirmé par l'intégration du spectre de RMN du dérivé perméthylé: $\delta = 0,68$ à 1,22 ppm 21 H, $7-CH_3$; $\delta = 3,25$ à 3,85 ppm 45 H, $15-OCH_3$.

C'est l'étude du spectre de masse du saponoside perméthylé, comparé à celui de la sapogénine, qui fournit les renseignements nécessaires à la reconstitution de la séquence. Les masses calculées sont reproduites dans le Tableau 1.

Compte tenu des résultats précédents, l'interprétation proposée du spectre de masse est la suivante.

Aucun ion moléculaire n'est décelé. Le premier pic différencié du bruit de fond se situe à la masse 1139. Le pic à la masse 657, $C_{40}H_{65}O_7$, correspond à un radical oléanolate de glucosyle perméthylé. La présence d'un tel corps est confirmée par l'existence de fragments

aux masses 613 ($-CH(O)-CH_2$), 593 (613-2 CH_3OH) et 549 (593- $CH(O)-CH_2$), d'une part et par celle du radical tétra *o*-méthyl 2,3,4,6 glucose à la masse 218 et de ses produits de fragmentations (m/e 187, $-CH_3O.$; m/e 155, 185- CH_3OH ; m/e 111, 155-

⁴E. L. HIRST, L. HOUGH et J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.* 928 (1949).

⁵R. SAVOIR, Contribution à l'étude des spectres de résonance magnétique nucléaire de triterpènes, Les groupes méthyles en série oléanolique, Thèse U.L.B. Faculté des Sciences (1966).

TABLEAU 1. HETEROATOMS LIMITS: C 13 = 0, N = 0, O = 10, Het = 10, ERR.:10

Calc. mass	Err.	C12/13	H	N	O	Measured mass
657,4728	- 1,95	40/0	65	0	7	657,4709
593,4203	- 2,31	38/0	57	0	5	593,4181
549,3943	- 5,37	36/0	53	0	4	549,3890
483,3837	- 1,83	32/0	51	0	3	483,3819
453,3731	- 1,95	31/0	49	0	2	453,3712
439,3575	- 2,38	30/0	47	0	2	439,3551
423,3625*	- 1,58	30/0	47	0	1	423,3610
405,1758	0,48	18/0	29	0	10	405,1763
395,3677	- 2,56	29/0	47	0	0	395,3651
393,3521	- 1,09	29/0	45	0	0	393,3509
361,1497	- 1,64	16/0	25	0	9	361,1481
248,1775	- 0,12	16/0	24	0	2	248,1774
218,1153	0,42	10/0	18	0	5	218,1158
203,1799	- 0,27	15/0	23	0	0	203,1796
187,0970	- 0,39	9/0	15	0	4	187,0966

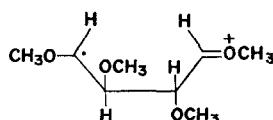
* Valeur non interprétée.

Dès lors, il devient évident que l'arabinose, le xylose, le glucose et l'acide uronique sont rattachés en position 3 de l'oléanolate, l'arabinose constituant le dernier maillon de la chaîne. C'est l'acide glururonique qui constitue le premier élément de la chaîne fixée en 3 de l'oléanolate ainsi qu'en témoignent les fragments aux masses 875, radical 3 (1-O- β -D glucuronopyranosyl) oléanolate de 1-(O- β -D glucopyranosyle) perméthylé, 405, radical

glucuronopyranosyl ($4 \rightarrow 1$) O- β -D-glucopyranosyle perméthylé et 361 (405—CH₂—CH₂), ces deux derniers indiquant, par ailleurs, que l'acide glucuronique est lié à la deuxième molécule de glucose.

Le xylose ne peut donc se placer qu'en troisième position dans la chaîne, entre le glucose et l'arabinose; c'est ce que confirme le fragment à la masse 335 (radical xylopyranosyl ($4 \rightarrow 1$) O- β -L-arabinopyranose perméthylé). L'acide tri O-méthyl 2,3,6 glucuronique se retrouve au niveau des masses 201 et 169 (201—CH₃OH), le tri O-méthyl 2,3,6 glucose à la masse 143 bien que, dans ce dernier cas, l'attribution ne puisse être faite avec certitude étant donné la fragmentation parallèle subie par les autres oses et notamment par le tétra O-méthyl 2,3,4,6 glucose. Le pic à la masse 175 confirme la présence du tri O-méthyl 2,3,4 arabinose.

Les pics aux masses 159, 101, 88, 75, 73, 71 et 45 indiquent, enfin, la présence de dérivés osidiques méthylés ou partiellement méthylés.⁶ Parmi ces pics, habituellement rencontrés lors de la fragmentation des oses perméthylés, il est utile de relever l'absence du pic à la masse 176 et correspondant à



(les fonctions méthoxyles en 2, 3 et 4 sont placées arbitrairement; ce fragment dériverait, en

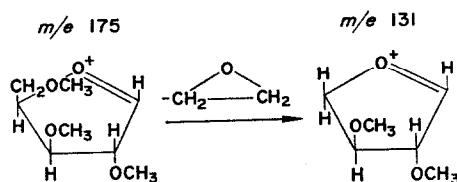
⁶ H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI et D. H. WILLIAMS, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, p. 222, Holden-Day, New York (1964).

réalité, d'une molécule de glucose perméthylée). Aucun des oses n'avait, par conséquent, de fonction hydroxyle libre en 1 et 4, avant la méthylation: ceci vient encore à l'appui de l'hypothèse des liaisons précédemment envisagées en 1-4 pour les dérivés osidiques fixés en 3 de l'oléanolate et en 1 pour l'oléanolate de glucosyle.

En ce qui concerne le triterpène lui-même, la fragmentation du radical dérivant de la fragmentation de l'oléanolate de glucosyle perméthylé (m/e , 549) est particulièrement intéressante à suivre lorsqu'elle est comparée à celle de l'acide oléanolique. Par rapport à ce dernier, il est évident que le pic à la masse 456, M^+ n'est pas retrouvé dans la fragmentation du saponoside perméthylé; par contre, les fragments aux masses 439 et 436 et plus encore les fragments aux masses 395, 203 et 248 (Retro Diels-Alder), communs ceux-ci, constituent une preuve irréfutable de la présence de l'acide oléanolique dans le saponoside.⁷

Configuration du Saponoside

La forme pyranose pour l'ensemble des oses découle normalement de l'examen de la fragmentation de leurs dérivés méthylés en spectrométrie de masse et de l'analyse chromatographique des molécules trouvées après l'hydrolyse du saponoside perméthylé. En ce qui concerne l'arabinose, l'absence de pic caractéristique à la masse 131 lève les doutes qui peuvent encore subsister quant à sa forme pyranosique. Un tel pic rendrait, en effet, plausible une fragmentation, à partir de la forme furanosique, dans les conditions suivantes:



La structure oléanolate de O - β -D glucosyle-1 est avancée comme hypothèse la plus probable en comparaison des résultats publiés pour d'autres saponosides à acide oléanolique, notamment pour les aralosides A et B.⁸ Pour des motifs analogues, nous imposons une liaison du type β -glucuronide en 3 de l'oléanolate de glucosyle. En ce qui concerne la détermination des autres liaisons osidiques, nous appliquons la méthode décrite par Klyne⁹ et qui s'appuie sur les mesures du pouvoir rotatoire moléculaire (Tableau 2). Seul l'ensemble des formes β -D pour le glucose, le xylose et l'acide glucuronique et β -L pour l'arabinose fournit un $\Delta C = -145^\circ$ ($-82^\circ,4$) + (-64°) + ($+109^\circ,7$) + ($-108^\circ,4$) voisin du $\Delta C = -177^\circ$, représentant la contribution effective de la chaîne osidique portée en 3 β . La saponoside aurait donc pour formule: 3-[1- O - β -D glucuronopyranosyl (4 \rightarrow 1) O - β -D-glucopyranosyl (4 \rightarrow 1) O - β -D-xylopyranosyl (4 \rightarrow 1) O - β -L-arabinopyranose] oléanolate de 1-(O - β -D-glucopyranosyle).

Ce saponoside, pour lequel nous proposons le nom de Bersamasaponoside, s'apparente à d'autres saponosides à acide oléanolique tels que ceux trouvés dans différentes espèces d'*Achyranthes*, d'*Aralia*, d'*Entada*, de *Luffa*, de *Mora* et de *Patrinia*.

EXPERIMENTALE

Les spectres d'absorption UV et IR sont respectivement enregistrés à l'aide des spectromètres Perkin-Elmer type 402 (UV-V) et type 237 (IR). Les mesures du pouvoir rotatoire sont effectuées sur un polarimètre

⁷ Ref. 6, p. 122.

⁸ N. K. KOCHETKOV; A. J. KHORLIN et V. E. VASKOVSKY. *Tetrahedron Letters* **16**, 713 (1962).

⁹ W. KLYNE, *Biochem. J.* **47**, xli (1950).

TABLEAU 2

[α] _D Saponoside	λ en nm
+ 9°,0	589
+ 9°,3	578
+ 10°,1	546
+ 18°,7	436
+ 123°,1	365
$[M]_D = \text{pouvoir rotatoire moléculaire du saponoside} = \frac{+ 9^\circ \times 1220}{100} \approx 110^\circ$	
[M] _D	ΔC
α	β
Oléanolate de <i>O</i> - β -D glucosyle-1 Saponoside	+ 287° + 110°
Contribution de la chaîne portée en 3- β de l' oléanolate de <i>O</i> - β -D glucosyle-1	+ 110° — + 287° — 177°
Glucuronate de méthyle	— 82°,4
D-Glucoside de méthyle	+ 312° — 64°
D-Arabinoside de méthyle	— 25°,3
L-Arabinoside de méthyle	+ 403°,5 + 109°,7
D-Xyloside de méthyle	+ 252°,4 — 108°,4

Perkin-Elmer type 141. Les spectres de RMN sont déterminés dans le CDCl_3 en présence de tétraméthylsilane comme étalon interne, au moyen d'un spectromètre de RMN Varian Modèle A 60. Un appareillage AEI modèle 902 est utilisé pour obtenir les spectres de masse et la détermination, au moyen de la technique du peak-matching, des masses exactes.

Les chromatographies en phase gazeuse sont réalisées sur un chromatographe Varian Aerograph type 1200 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne de 6 pieds de longueur et de 1/8 de pouce de diamètre, garnie de 3% d'OV-17 sur chromosorb W.A.W. DMCS 100-120 mesh: la température est fixée à 130° et le débit réglé à 32 ml/min.

La chromatographie sur couches minces s'effectue, pour les opérations préparatives, sur des chromatoplaques de verre (20×40 cm) recouvertes de 60 g de gel de silice H Merck et pour les opérations de contrôle sur des chromatoplaques (20×20 cm) recouvertes de 6 g du même adsorbant. La séparation du saponoside demande, pour phase, un mélange constitué de CHCl_3 -MeOH-EtOH-ammoniaque à 17% (10:5:5:1) tandis que pour celle de l'acide oléanolique, elle est constituée du mélange hexane- CHCl_3 -acétone (9:9:2). Une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans le CHCl_3 permet la révélation du saponoside et de la sapogénine (spots rose à froid, bleu-violacé à chaud).

Le papier Whatman No. 1 est utilisé pour la chromatographie sur papier effectuée suivant la technique descendante. Les phases sont constituées d'un mélange acétate d'EtO-pyridine-H₂ (8:2:1) pour les oses et d'un mélange n-BuOH-EtOH-H₂O (4:1:1) pour l'acide uronique. La révélation est opérée par pulvérisation du phthalate d'aniline, du chlorure de triphényltétrazolium et du système benzidine-acide périodique.

Les écorces de *Bersama yangambiensis* Toussaint ont été récoltées à Yangambi (République Démocratique du Congo) en 1969 et stabilisées dès réception. L'herbier a été comparé avec celui déposé au Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles.

Isollement du saponoside. 10 kg d'écorces réduites en poudre fine sont extraites par percolation avec de l'EtOH à 94° jusqu'à disparition de la coloration caractéristique (rose à violacé), donnée par le résidu d'évaporation de quelques gouttes de teinture, en présence d'H₂SO₄ à 85%. L'extrait obtenu après distillation, sous pression réduite, des solutions éthanoliques est chromatographié sur une colonne de 8 kg de cellulose Macherey-Nagel 2100ff avec une phase mobile à polarité croissante, composée successivement d'éther de pétrole (Eb. 20-70°), de benzène, de MeOH et d'H₂O. Les fractions des solutions méthanoliques et hydro-méthanoliques présentant la réaction colorée à l'H₂SO₄ sont réunies et soumises à une dialyse, après élimination du MeOH et filtration. La solution contenant l'indialysable est évaporée à sec et le résidu d'évaporation chromatographié sur couches préparatives, prélavées au méthanol, avec pour phase, un mélange constitué de CHCl_3 -MeOH-EtOH-H₂O (3:3:2:1). L'extraction de la bande d'adsorbant contenant le saponoside (détecté sur une bande marginale de la chromatoplaque) par du MeOH, donne une solution à partir de

laquelle le saponoside cristallise immédiatement. $F \approx 250$ (avec décomposition). Spectre UV (MeOH): maximum à 210 nm.

Hydrolyse du saponoside. La solution de 100 mg de saponoside, dissous dans 30 ml d'H₂O, 40 ml d'H₂SO₄ 4 N et 20 ml de MeOH, est traitée à 100°, pendant 9 hr, dans une ampoule scellée et sous azote. La solution, dont on élimine le MeOH par évaporation partielle, laisse précipiter la sapogénine, éliminée de la solution aqueuse par extractions répétées au CHCl₃.

Purification de la sapogénine. Le résidu d'évaporation de la solution CHCl₃ est purifié par chromatographie sur couches préparatives avec pour phase le mélange benzène-hexane-acétone-MeOH (5:5:2:2). La cristallisation de la sapogénine, isolée à partir de l'adsorbant, est obtenue dans le système de solvant CHCl₃-hexane. $F \approx 300^\circ$ [α]_D $\approx 76^\circ$ (CHCl₃) Spectre UV (MeOH): maximum à 210 nm. Spectre de RMN

$$\begin{aligned}\delta &= 0,79 \text{ ppm; } 2-\text{CH}_3, \text{C}_{24} \text{ et C}_{26} \\ \delta &= 0,94 \text{ ppm; } 3-\text{CH}_3, \text{C}_{25}, \text{C}_{29} \text{ et C}_{30} \\ \delta &= 1,00 \text{ ppm; } 1-\text{CH}_3, \text{C}_{23} \\ \delta &= 1,15 \text{ ppm; } 1-\text{CH}_3, \text{C}_{27}\end{aligned}$$

Purification de la solution aqueuse. Une fraction de la solution aqueuse des oses est passée, pour désacidification, sur Amberlite MB3, puis évaporée à sec et reprise dans la pyridine anhydre. L'autre partie, neutralisée par addition de carbonate de baryum, est conservée pour la recherche de l'acide uronique.

Silylation des dérivés osidiques. La silylation est opérée à partir de la solution pyridinique soit des oses, soit de l'acide uronique, traitée par l'hexaméthyldisilazane et le triméthylchlorsilane.

Perméthylation du saponoside. 100 mg du saponoside, dissous dans la diméthylformamide, sont traités, à plusieurs reprises, par l'iode de méthyle en présence d'oxyde d'argent, dans les conditions décrites par Polonsky, Sach et Lederer.¹⁰ La purification du dérivé est opérée par chromatographie sur couches préparatives avec pour phase le mélange CHCl₃-MeOH (9:1). Le composé obtenu est amorphe (60 mg). La spectrométrie d'absorption IR permet d'en vérifier la totale méthylation (absence de bande—OH). Spectre de RMN. Cf celui de la sapogénine pour les groupements méthyles.

$$\delta = 3,25 \text{ à } 3,85 \text{ ppm } 45 \text{ H, } 15 -\text{OCH}_3$$

Hydrolyse du dérivé perméthylé. 50 mg, dissous dans 2,7 ml de MeOH et 0,11 ml d'H₂SO₄ concentré, sont chauffés pendant 10 h, à reflux et sous azote. La solution d'hydrolyse, diluée par 10 ml d'H₂O, est évaporée partiellement jusqu'à disparition du MeOH puis chauffée à reflux pendant 4 h. La sapogénine précipite spontanément et est isolée. La solution aqueuse acide est ensuite traitée parallèlement à celle obtenue par hydrolyse du saponoside.

Réaction de Tollen. Une solution de 10 mg du saponoside dans quelques ml d'HCl à 18 % sont portés à l'ébullition pendant 30 sec en présence de 100 mg de naphtorésorcinol. Par refroidissement, des flocons bruns apparaissent dans la solution colorée en vert et l'extraction de cette solution, par le benzène, colore ce dernier en violet.

¹⁰ J. POLONSKY, E. SACH et E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 880 (1959).

Key Word Index—*Bersama yangambiensis*; Melianthaceae; saponins; oleanolic acid glycoside.