



THÈSE

Présentée à l' Université de Ouagadougou
pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Option : Substances Naturelles

par

Éloi PALÉ

Maître ès sciences
Diplômé d' Études Approfondies
Docteur 3^{ème} cycle

Thème :

ÉTUDE DES ANTHOCYANES DE PLANTES DU BURKINA FASO : STRUCTURES ET ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES

Soutenance publique le 24 janvier 2002 devant la commission d' examen

Président : Mouhoussine NACRO, Professeur, Université de Ouagadougou

Examineurs : Faustin Sié SIB, Professeur, Université de Ouagadougou
Yves CHAPLEUR, Professeur, Université Henri Poincaré Nancy I
Chantal MENUT, Professeur, Université de Montpellier II
Kossi Honoré KOUMAGLO, Professeur, Université du Bénin
Marie KOUDA-BONAFOS, Maître de Conférences, Université de
Ouagadougou

JE DÉDIE CE MÉMOIRE

À LA MÉMOIRE DE MON ONCLE HÉDJITÉ

À MES PARENTS KOLIMANTÉ ET SIPKÉNIYEN

À MES BEAUX-PARENTS HUBERT ET HÉLÈNE

***À MON ÉPOUSE ET MES ENFANTS DONT LA TENDRESSE ET
L'AMOUR***

M'ÉPANOUISSENT

À TOUS MES FRÈRES ET SŒURS

REMERCIEMENTS

Merci infiniment à Monsieur Mouhoussine NACRO, professeur titulaire de chimie à l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences Exactes et Appliquées (UFR-SEA) de l'Université de Ouagadougou, Directeur du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée. Vous m'avez permis, en m'accueillant dans votre laboratoire en Octobre 1992, d'être Diplômé d'Études Approfondies en 1994, Docteur de 3^m cycle en 1998 et de présenter aujourd'hui ma thèse de Doctorat d'État. Pour ce faire vous n'avez ménagé aucun effort pour me trouver les voyages d'études grâce auxquels ce travail a été réalisé. Vos conseils et appuis constants à tous les niveaux m'ont été indispensables. Professeur, merci encore pour avoir accepté de présider ce jury.

À Madame Marie KOUDA-BONAFOS, maître de conférences de chimie à l' UFR-SEA de l'Université de Ouagadougou, sans qui ce document n'aurait vu le jour, j'exprime toute ma reconnaissance. Votre rigueur dans le travail, vos critiques scientifiques objectives, permanentes et pertinentes ont été capitales dans l'aboutissement de ce travail. J'ai été vraiment content de travailler avec vous. Aussi, vous avez accepté de juger ce travail en faisant partie du jury. Merci beaucoup.

À Monsieur Maurice VANHAELLEN, professeur titulaire de pharmacie à la Faculté de Pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles (ULB), Belgique, tous mes remerciements. Il m'a accueilli plusieurs fois dans son laboratoire et a conduit l'identification et la caractérisation de tous les composés étudiés. La disponibilité permanente de son équipe a été d'une très grande importance dans la réussite de cette mission. De plus il a accepté de Juger ce travail en tant que rapporteur. Merci à vous et votre équipe.

Que Monsieur Michel HANOCQ, professeur titulaire de pharmacie à la Faculté de Pharmacie de l'ULB, et Madame Noèle LEJEUNE, Directrice au département des relations internationales de la cellule de coopération de l'ULB, reçoivent l'expression de ma sincère reconnaissance pour avoir constamment œuvré à faciliter mes séjours parmi eux.

À Monsieur Timothy Johns, PhD, et son équipe à " School of Dietetics and Human Nutrition, Macdonald Campus, McGill University, Ste-Anne de Belvue (québec), H9X 3V9 Canada" j'exprime toute ma gratitude car c'est dans son laboratoire que j'ai appris la mise au point des différents tests de mesure des activités anioxydantes.

Mes remerciements à Monsieur Justin NIKIÉMA, Technicien du laboratoire, pour sa

disponibilité et son dévouement permanent, à ALPHA Keita Djibo et ANDZI-BARHÉ Timoléon, pour leurs franches collaborations.

Je ne saurais présenter ce travail sans renouveler mes remerciements à tous ceux qui ont assuré ma formation au cours du Doctorat de 3^{ème} cycle : les professeurs Harouna TRAORÉ (Laboratoire d'électrochimie), Guy Venance OUEDRAOGO (Laboratoire de Chimie de Coordination et responsable de troisième cycle), Siméon KABRÉ (Laboratoire de Physico-Chimie et de Technologie des Matériaux, Jean B. LEGMA (Directeur de l'UFR-SEA) et Ali BAHOUN.

Merci à mon épouse pour sa patience et sa compréhension, mes parents, amis et tous ceux qui m'ont soutenu moralement et / ou matériellement pour l'aboutissement de ce travail.

Ce travail a été réalisé grâce aux appuis financiers de l'AUPELF-UREF / FICU (Canada) et du Fonds Léopold MOLLE de l'ULB. C'est ainsi que tous les spectres de RMN et de Masse ont pu être enregistrés à l'Université Libre de Bruxelles (ULB). Les dernières analyses concernant une partie des mesure des activités antioxydantes ont pu être effectuées avec le soutien financier de la Fondation Internationale pour la Science (F.I.S.).

Aux Membres du Jury

Je remercie le Professeur Faustin Sié SIB pour avoir accepté d'être membre du jury comme rapporteur. Il fut l'artisan de ma formation aux techniques d'analyse RMN en chimie. Merci encore.

Je remercie le Professeur Yves CHAPLEUR d'accepter de faire partie du jury comme membre rapporteur. Je le remercie également pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire à l'Université de Nancy I. J'ai obtenu avec lui une fructueuse collaboration. Qu'il reçoive ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Grâce aux discussions très pertinentes avec le Professeur Honoré KOUMAGLO lors des différentes rencontres scientifiques, j'ai pu acquérir des connaissances supplémentaires. Pour cela et pour avoir accepté d'être membre du jury, je le remercie.

Je remercie le Professeur Chantal MENUT de nous avoir fait un grand bonheur en acceptant de faire partie du jury.

Avant Propos

Dans les annexes nous décrivons les différentes molécules isolées et nous rapportons les travaux présents et antérieurs sous forme de publications.

Pour la description des molécules isolées, nous ne nous sommes intéressés qu'aux structures moléculaires nouvelles. Les autres ayant déjà fait l'objet de description dans le dictionnaire des substances naturelles (voir bibliographie 42, p. 106). Aussi, nous décrivons la 7-O-méthylapigénidine parce qu'elle n'a pas fait l'objet d'une description dans nos travaux antérieurs.

Il ne nous a pas été possible de mesurer les activités anti-oxydantes de certains composés minoritaires par manque de produits en quantité suffisante.

<u>TABLE DES MATIÈRES</u>	PAGES
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I : ÉTUDE DES ANTHOCYANES DE QUATRE PLANTES DU BURKINA FASO.....	
1 - Généralités sur les anthocyanes étudiées.	4
2 - Étude d'un glucoside de la cyanidine isolé de <i>Terminalia catappa</i>	9
2.1 - Contexte bibliographique.	10
2.2 - Résultats et discussions.	10
3 - Étude d'un diglycoside de la cyanidine isolé de <i>Adenium obesum</i>	17
3.1 - Contexte bibliographique.	18
3.2 - Résultats et discussions.	18
4 - Étude de quatre anthocyanosides isolés des fleurs de <i>Jatropha integuerrima</i>	27
4.1 - Contexte bibliographique.	28
4.2 - Résultats et discussions.	28
5 - Isolement et étude de quatre nouvelles anthocyanes acylées de <i>Ipomoea asarifolia</i>	37
5.1 - Contexte bibliographique.	38
5.2 - Résultats et discussions.	38
5.2.1 – Étude du composé <u>1</u>	40
5.2.2 – Étude du composé <u>3</u>	50
5.2.3 – Étude du composé <u>5</u>	60
5.2.4 – Étude du composé <u>8</u>	71

	PAGES
6 - Étude comparative des activités antioxydantes des anthocyanes isolées.	87
CHAPITRE II : PERSPECTIVES.	89
1 - Sources potentielles et utilisations des anthocyanes au Burkina Faso. . .	89
2 – Structure et activité antioxydante	91
CONCLUSION GÉNÉRALE.	92
Partie expérimentale.	94
1 - Préparation du matériel végétal.	94
2 - Purification et séparation des anthocyanes.	94
3 - Analyses chimiques et spectrales.	96
BIBLIOGRAPHIE	100
ANNEXE I : DESCRIPTION DE QUELQUES ANTHOCYANES	
ISOLÉES.	113
ANNEXE II à VI : PUBLICATIONS	117

INTRODUCTION GÉNÉRALE

"Produit Bio", c'est sans doute le label le plus prisé à nos jours, comme si consommer naturel était nouveau. La nature a eu raison des hommes. En effet, la faible disponibilité des produits naturels a provoqué un développement extraordinaire de la chimie de synthèse qui a très vite montré ses limites. Ainsi nous observons aujourd'hui un retour à la consommation de produits directement tirés de la nature. Parmi ces produits figurent les composés anthocyaniques. Ces derniers sont des dérivés glycosylés du cation flavylum. L'histoire nous indique qu'ils ont toujours été tirés de la nature. Les tentatives de synthèse n'ont intéressé en réalité qu'une classe particulière de ces composés : les 3-désoxyanthocyanidine^[1, 2], composés jaunes en milieu acide et rouge en milieu basique.

Les anthocyanes sont responsables de la coloration d'un grand nombre de produits (jus, vins, confitures, etc.). Au Burkina Faso, les gaines du sorgho teinturier, particulièrement riche en apigénidine^[3-6], sont utilisées dans la teinture des cuirs et peaux. Les calices des fleurs de l'oseille de Guinée (*Hibiscus sabdariffa*), utilisés comme ingrédients dans la fabrication de boissons locales, sont très riches en anthocyanes^[7, 8].

Les composés anthocyaniques les plus utilisés jusqu'aujourd'hui sont les mono et diglycosides de la cyanidine et de la delphinidine comme c'est le cas des extraits de myrtille^[9, 11] et du jus de raisin, beaucoup consommés en Europe, du jus de calices d'oseille de Guinée et du fruit du raisinier d'Afrique (*Lannea microcarpa*)^[8, 12] très consommés en Afrique.

L'étude des polyphénols en général et des composés anthocyaniques en particulier connaît un intérêt grandissant. Cela est sans doute dû aux nouvelles propriétés pharmacologiques qui leur sont reconnues. En effet, d'après le "french

paradox" (paradoxe français) (German et Dillard, 1998) ^[13], les Français connaîtraient moins de maladies cardiovasculaires que les Américains, qui consomment pourtant beaucoup moins d'alcool ; cela serait dû au vin que les premiers ont l'habitude de consommer quasi quotidiennement. En effet, le jus de raisin fermenté (vin) ou non est très riche en polyphénols dont les anthocyanes. Il est démontré aujourd'hui que les anthocyanes rendent les capillaires moins perméables et augmentent leur résistance. D'autre part les anthocyanes sont très réactives vis-à-vis des radicaux libres dans l'organisme. Les activités antiarthérosclérosiques des anthocyanes ont été récemment montrées par Morazzoni (1996) ^[9, 10] et Wakabayashi (1999) ^[14]. Une équipe du professeur John Folts (1999) ^[15] montra que la consommation de jus de raisin pendant deux semaines augmente l'élasticité des vaisseaux sanguins tout en diminuant le taux d'oxydation du cholestérol chez les malades atteints d'une maladie de l'artère coronaire ; la résistance des vaisseaux s'en trouverait ainsi triplée.

Au vu de ces nouveaux intérêts, la recherche de molécules nouvelles telles que les anthocyanes acylées présenterait deux avantages :

- elles sont relativement plus stables que leurs homologues non acylés ;
- les acides phénoliques étant eux-mêmes antioxydants, l'association anthocyanes-acides phénoliques pourrait renforcer les propriétés pharmacologiques.

Ce travail est la suite de nos investigations antérieures au cours desquelles nous avons isolé et caractérisé des molécules anthocyaniques dans de plantes entrant exclusivement dans l'alimentation humaine ^[8, 12, 16, 17] (Annexes, p. 114). L'intérêt grandissant de ces molécules nous ont porté vers la recherche d'autres sources et types de molécules anthocyaniques telles que les anthocyanosides acylés.

Dans le premier chapitre de ce travail, nous traitons de molécules à propriétés colorantes et pharmacologiques. Nous avons isolé et caractérisé dix

composés anthocyaniques dans quatre plantes différentes : *Adenium obesum*, *Terminalia catappa*, *Jatropha integrerrima* et *Ipomoea asarifolia*. Les quatre nouvelles molécules isolées de *I. asarifolia* constituent la partie la plus importante de ce mémoire. Des tests sur les activités antioxydantes ont été effectués sur les composés majoritaires isolés. Cela nous a permis de faire une étude comparée des activités antioxydantes de tous ces composés.

Le deuxième chapitre ouvre des perspectives sur les potentielles sources de ces molécules en Afrique en général et au Burkina Faso en particulier, et leur productibilité en vu de la valorisation de ces espèces végétales du Burkina Faso. Une étude sur la corrélation entre la structure des anthocyanosides et leurs activités antioxydantes a été initiée et nous comptons, dans un futur proche, approfondir ce volet.

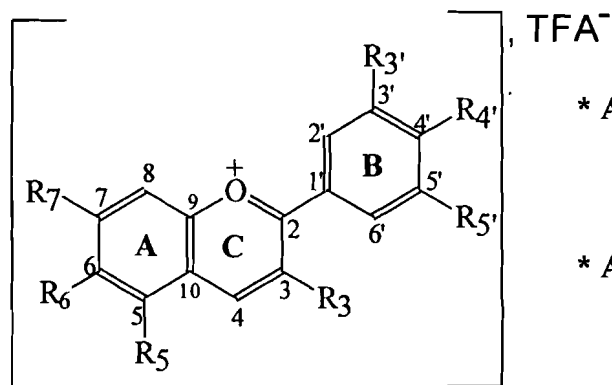
CHAPITRE I :

ÉTUDE DES ANTHOCYANES DE QUATRE PLANTES DU BURKINA FASO

1 – Généralités sur les anthocyanes étudiées.

Les anthocyanes sont des composés très polaires de la famille des flavonoïdes. On les rencontre dans presque toutes les parties aériennes des plantes. Obtenues au laboratoire sous la forme de sels (chlorure ou trifluoroacétate) elles existent dans les plantes en association avec des bases conjuguées d'acides organiques ainsi que des métaux.

Les anthocyanes sont constituées du noyau flavylium (2-phénylbenzopyrylium). Les différents substituants sur ce noyau permet obtenir toutes les couleurs rencontrées dans la nature. Les anthocyanidines (Fig. 1) sont constituées du noyau flavylium et de substituants hydroxyles et/ou méthoxyles. Ces derniers étant très peu stables, les anthocyanes les plus répandues dans la nature sont sous forme de glycosides ^[18, 19] ; La présence d'un sucre les rend beaucoup plus solubles dans les solvants polaires comme l'eau.



* Anthocyanidine :

R₃, R₅, R₆, R₇, R₃' ,

R₄' et R₅' sont H, OH ou OCH₃

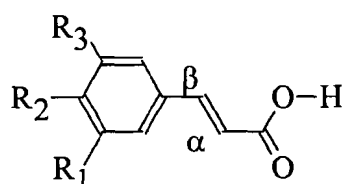
* Anthocyanoside : R₃ est H ou glucosyle

R₅, R₆, R₇, R₃' , R₄ et R₅' sont H, OH ou OCH₃ ou glucosyle.

Nom	Formule brute (PM)*	Substitutions						
		3	5	6	7	3'	4'	5'
Aurantidine (Au)	C ₁₅ H ₁₁ O ₄ (287)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Capensidine (Cp)	C ₁₈ H ₁₇ O ₆ (329)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe
Cyanidine (Cy)	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (287)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphinidine (Dp)	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ (303)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Europinidine (Eu)	C ₁₇ H ₁₅ O ₇ (331)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Hirsutidine (Hs)	C ₁₈ H ₁₇ O ₇ (345)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe
6-Hydroxycyanidine (6-OHCy)	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ (303)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
Malvidine (Mv)	C ₁₇ H ₁₅ O ₇ (331)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
5-Méthylcyanidine (5-MeCy)	C ₁₆ H ₁₃ O ₄ (301)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H
Pélagonidine (Pg)	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ (271)	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Paeonidine (Pn)	C ₁₆ H ₁₃ O ₅ (301)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Pétunidine (Pt)	C ₁₆ H ₁₃ O ₇ (317)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
Pulchellidine (Pl)	C ₁₆ H ₁₃ O ₇ (317)	OH	OMe	H	OMe	OH	OH	OH
Rosinidine (Rs)	C ₁₇ H ₁₅ O ₆ (315)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Apigénidine [‡] (Ap)	C ₁₅ H ₁₁ O ₄ (255)	H	OH	H	OH	H	OH	H
7-MéthylApigénidine [‡] (7-MeAp) ^[17]	C ₁₆ H ₁₃ O ₄ (269)	H	OH	H	OH	H	OH	H
Carajurine [‡] (Cr)	C ₁₇ H ₁₆ O ₅ (300)	H	OH	OMe	OH	H	OMe	H
Tricétinidine [‡] (Tr)	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (287)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH
Lutéolinidine [‡] (Lt)	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ (271)	H	OH	H	OH	OH	OH	H

* PM = Poids Moléculaire ; ‡ groupe des 3-désoxyanthocyanidines

Figure 1. Anthocyanidines naturelles



$R_1 = R_2 = R_3 = H$: Acide cinnamique

$R_1 = R_3 = H$ et $R_2 = OH$: Acide coumarique

$R_1 = R_2 = OH$ et $R_3 = H$: Acide caféique

$R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Acide syringique

$R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$ et $R_3 = H$: Acide férulique

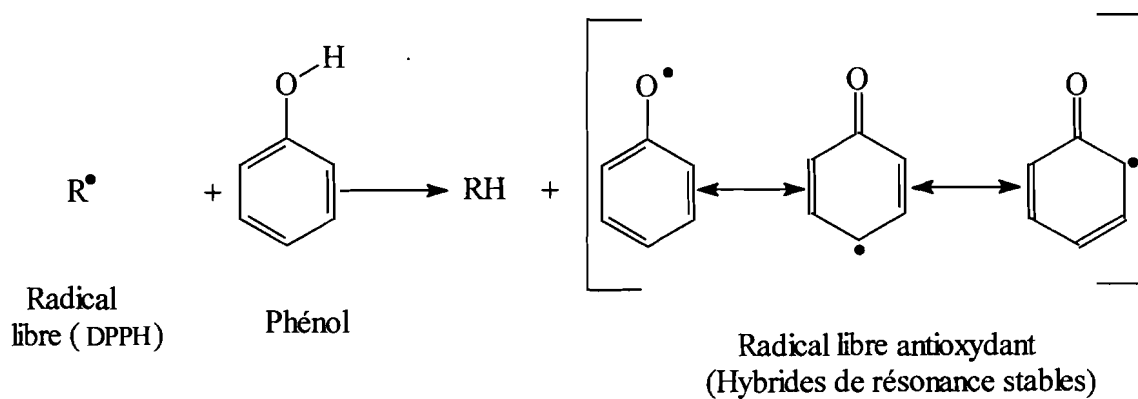
$R_1 = R_3 = OCH_3$ et $R_2 = OH$: Acide sinapique

Figure 2. Acides phénoliques estérifiés avec les composés anthocyaniques

Le développement des techniques d'analyse a permis la découverte et l'étude de molécules anthocyaniques de plus en plus complexes telles que les anthocyanes acylées (Fig. 4). Notons que l'acylation se fait toujours sur un sucre, généralement en position 6 de celui-ci. Mais si l'acylation stabilise davantage l'anthocyane, elle a tendance à diminuer sa solubilité dans l'eau et l'éthanol. Les composés isolés dans *I. asarifolia* sont de cette famille. Pour cette étude, nous avons utilisé des techniques d'analyses modernes comme les spectrométries UV-Visible, Infrarouge, Masse (FAB & Electro-spray), RMN, etc.

La mesure de l'activité antioxydante in vitro de ces molécules peut être effectuée à l'aide de plusieurs méthodes dont le test au 2,2-diphényl-1-1-1-1-tétrahydro-5H-pyridine (DPPH). Ce dernier absorbe vers 517 nm dans le méthanol et les produits de la réaction n'absorbent plus que vers 470 nm. D'après Sherwin (1990)^[20], la réaction des radicaux libres sur les composés phénoliques se fait de la manière suivante :

a) pour un groupement phénol



b) pour un groupement orthodiphénol

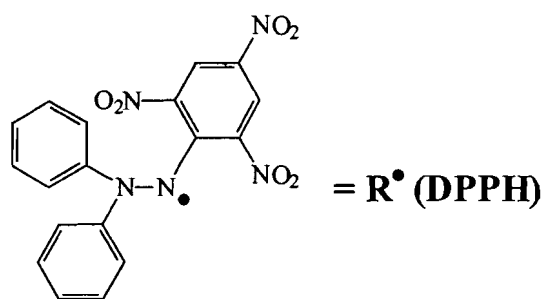
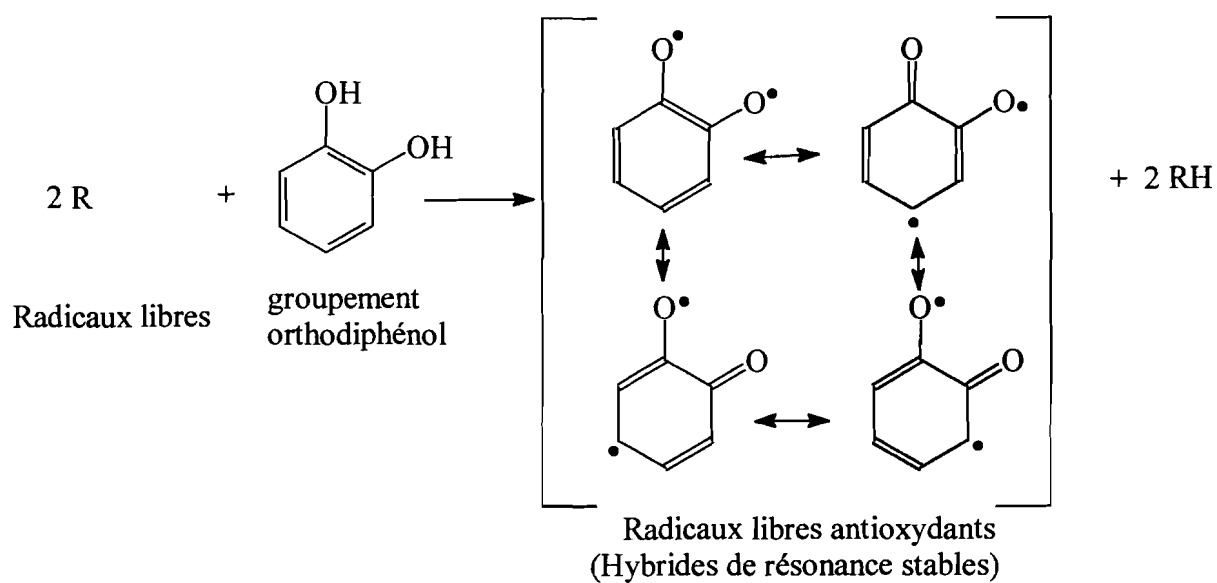


Figure 3. Réaction des radicaux libres sur les composés phénoliques [20-25].

Il est donc possible de suivre la réaction par spectrophotométrie dans le visible et de comparer l'intensité colorante 50 (IC_{50}) de la substance étudiée à celle d'un antioxydant connu tel que l'acide ascorbique. L' IC_{50} peut être définie comme étant la quantité de réactif nécessaire pour réagir avec 50 ppm du produit à tester. Ainsi ce dernier est d'autant plus actif que l' IC_{50} est grand. Mais l' IC_{50} peut aussi être définie comme étant la quantité de produit nécessaire pour faire diminuer la coloration de la solution de réactif (DPPH) de moitié (50%) [24-25]. C'est ce cas que nous avons considéré dans notre étude. Le produit est d'autant plus actif que l' IC_{50} est faible.

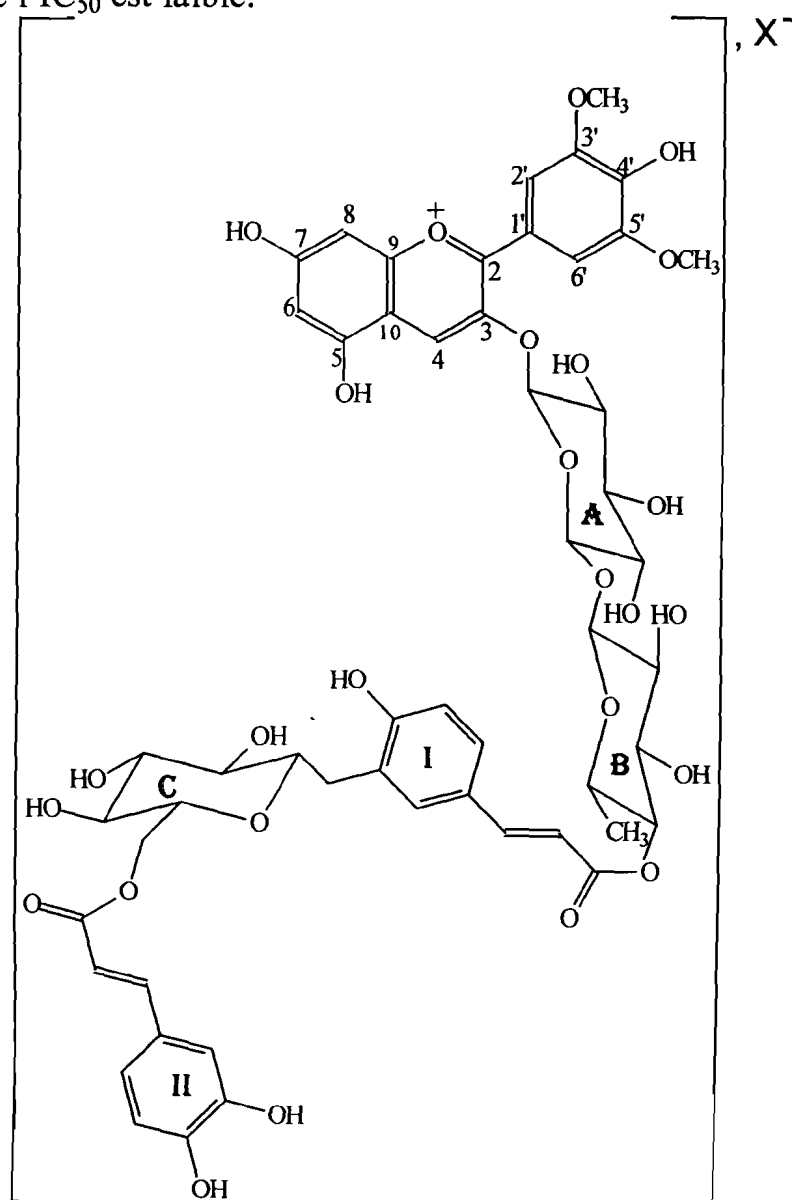


Figure 4. Anthocyanoside acylé isolé de *Petunia integrifolia* [26]

2 – Étude d'un glucoside de la cyanidine
isolé de *Terminalia catappa*



plante



fruits

Planche 1 : *Terminalia catappa*

2.1 – Contexte bibliographique

T. catappa est un arbre de 6 à 12 m de haut, de la famille des Combretaceae dans l'ordre des Myrtales. C'est un arbre à ramification plagiotrope et à feuilles scabres alternes. Les fleurs sont en panicules axillaires de couleur blanc-verdâtre. Les fruits, comestibles et globuleux, sont rouges ou verts ^[6]. La présence des anthocyanes dans le fruit de la plante n'a jamais été signalée.

2.2 - Résultats et discussion

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) de l'extrait méthanolique du fruit de *T. catappa* a permis de ne détecter qu'un pigment majoritaire (**1**) [$t_R = 18,3$ mn (99%)] (Fig. 5). Pour l'élution, un gradient linéaire d'un système binaire de solvants a été appliqué : de 20 à 50 % de B dans A (voir partie expérimentale, p. 96) pendant 20 minutes, puis ces conditions finales d'élution ont été maintenues isocraquement pour 10 minutes.

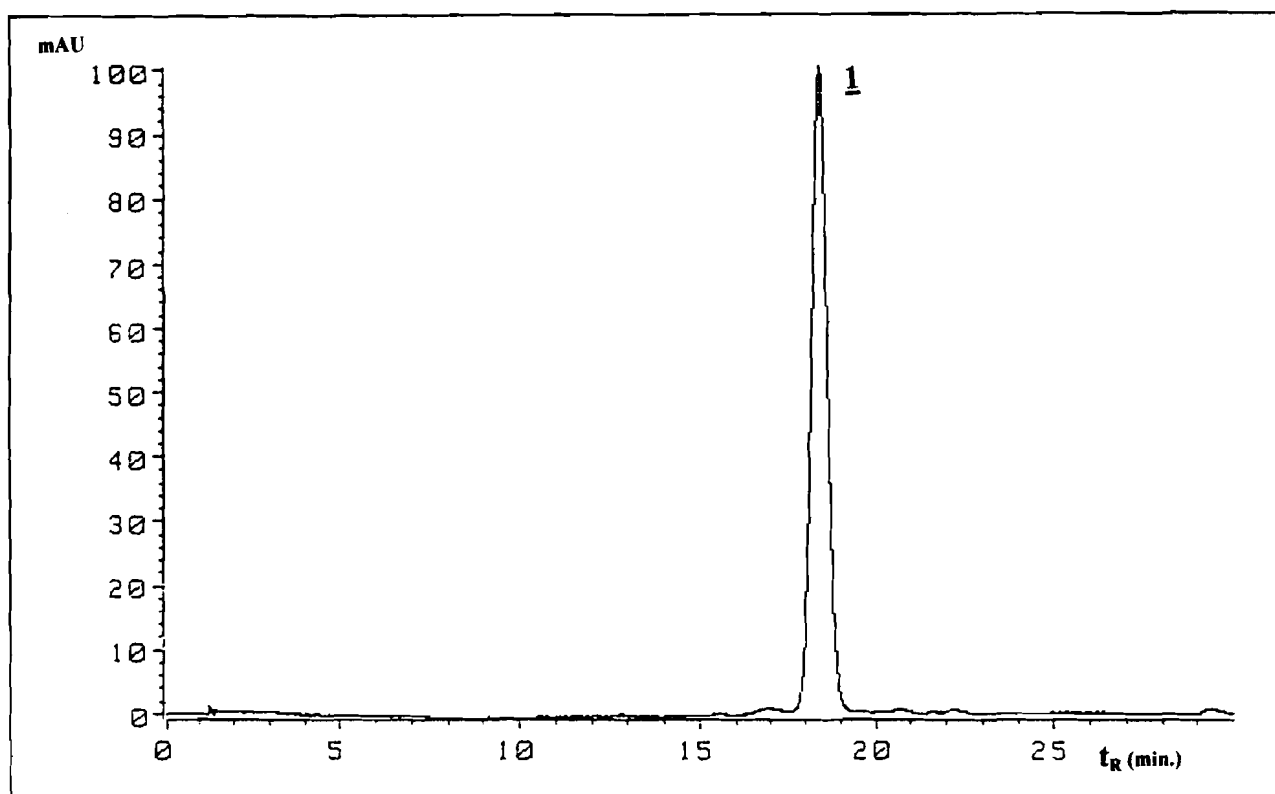
Après purification (voir protocole, p. 94), les données (Références frontales, R_f) en chromatographie sur couche mince (CCM) standard, celles du spectre électronique et les temps de rétention en CLHP et CPG (chromatographie en phase gazeuse) ainsi que les produits de l'hydrolyse totale du pigment ont été effectués et sont consignés dans le Tableau 1 (p. 13). En spectroscopie de masse (SIMS), nous observons l'ion moléculaire à 449, correspondant à la formule $[C_{21}H_{21}O_{11}]^+$. De plus, l'analyse des fragments secondaires indique bien que $[M-162]$ correspond à la perte d'un hexosyle (glucosyle, galactosyle, etc.) $[C_6H_{10}O_5]$. En effet, les résultats de la CPG (Tableau 1.) indiquent que le composé comporte un glucosyle. Aussi, d'après les données des spectres électroniques et résonance magnétique nucléaire du proton

(RMN- ^1H ; Fig. 8, p. 16 et Tableau 2, p. 14), le composé est un dérivé monoglycosylé de la cyanidine. Le déplacement chimique du proton anomérique ($\delta \sim 5,3$ ppm) et le rapport $\epsilon_{440}/\epsilon_{\text{max.vis.}}$ (Tableau 1, p. 13) est caractéristique des anthocyanidine 3-O-glycoside^[5, 27-30]. En outre, la valeur élevée de la constante de couplage observée pour le signal du proton anomérique du glucosyle ($J \sim 7-8$ Hz) suggère que celui-ci soit sous la forme β -D-glucopyranose.

Ainsi, le composé 1 de *Terminalia catappa* a été identifié comme étant la cyanidine 3-O- β -D-glucopyranoside (Fig. 6, p.16).

La teneur du pigment, calculée en cyanidine monoglucoside est de 0,4 g pour 100 g de matière sèche.

D'après la figure 7 (p. 15), l'IC₅₀ du composé 1 de *T. catappa* est de 18,7 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Celle de l'acide ascorbique (vitamine C) est d'environ 22 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ^[25]. Le composé 1 de *T. catappa* est légèrement plus antioxydant que la vitamine C.



mAU = milli Unité d'Absorbance (Absorbance x 1000)

Figure 5. Chromatogramme CLHP d'un extrait méthanolique du fruit de *T. catappa*.

Tableau 1. Données spectrales et chromatographiques de l'anthocyanoside majoritaire (**1**) du fruit de *T. catappa*.

R _f en CCM (x100)					CLHP	CPG t _R (min)			Données des spectres électroniques (0,1% MeOH-HCl)		SIMS
BAW	BuHCl	HCl 1%	AcHW	EFAW	t _R (mn)	α	β	sucres correspondants	λ _{max.} [logε] en nm	E ₄₄₀ /E _{max.} (%) [+AlCl ₃] [†]	m/z
*	*	*	*	**							
28	12	07	20	43	18,30	19,01	20,95	glucose	282 [4,15] 529 [4,42]	20 [+]	[M] ⁺ 449 [M-162]287

* Adsorbant = cellulose microcristalline F254 (0,1 mm ; Merck), BAW = Butan-1-ol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5), phase supérieure, BuHCl = Butan-1-ol - 2 N acide chlorhydrique (1 : 1), phase supérieure, HCl 1% = Acide chlorhydrique conc. - eau (3 : 97), AcHW = Acide acétique - eau (15 : 85); ** Adsorbant = silice 60 (0,1 mm ; Merck), EFW = Acétate d'éthyle - acide formique - acide acétique - eau (100 : 11 : 11 : 26) ^[18, 19, 30, 32]; † Addition de 2-3 gouttes de chlorure d'aluminium : + = effet bathochrome ; 0 = aucun d'effet.

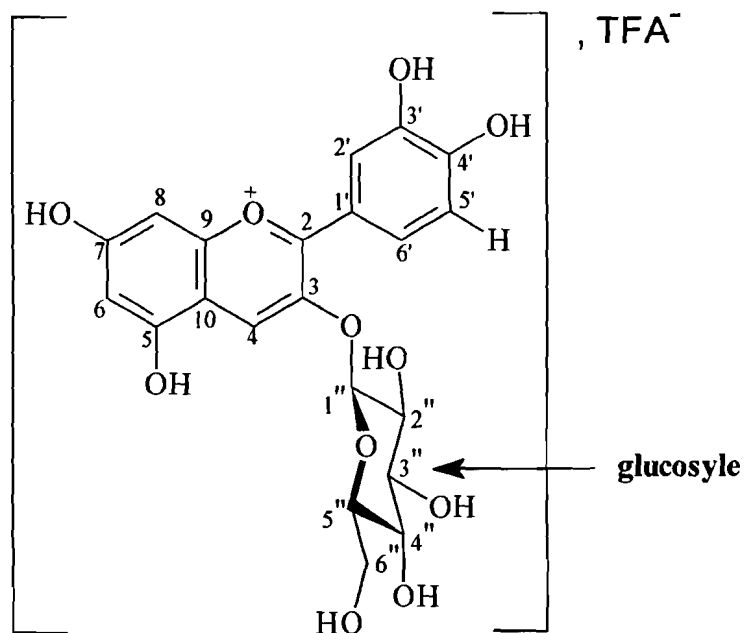


Figure 6. Cyanidine 3-*O*- β -D-glucopyranoside (composé 1 isolé du fruit de *T. catappa*)

Tableau 2. Données RMN-¹H de l'anthocyanoside majoritaire (1) du fruit de *T. catappa*

	<u>1</u> δ (ppm) J (Hz)
Aglycone	Cyanidine
H4	8,90 ; s
H6	6,79 ; d 1,3
H8	6,63 ; d 1,9
H2'	7,94 ; d 2,3
H5'	6,94 ; d 8,7
H6'	8,10 ; dd 2,3 ; 8,7
sucres*	β -D-glucopyranosyle
H1	5,30 ; d 7,5
H2'', H3'', H4'', H5'' et H6'' _a , H6'' _b	3,50 ~ 4,10

* Attribution faite d'après les constantes de couplage et les données de la littérature [27-29, 33, 34].
 Multiplicité : s = singulet, d = doublet, dd = double doublet.

concentration (en ppm)	DO _{517 nm}
0	0,92
3,37	0,75
6,73	0,63
10,04	0,53
13,46	0,51
16,83	0,4
IC ₅₀ =	18,7 µg / ml

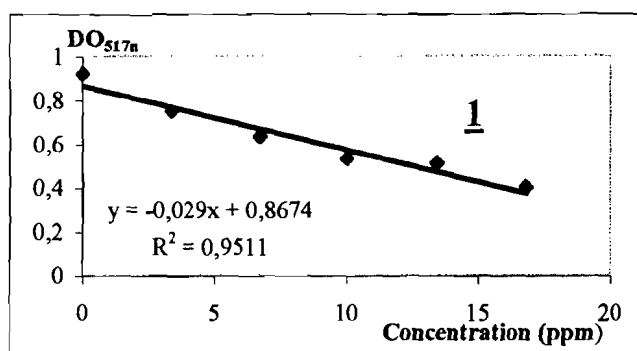


Figure 7. Mesure de l'activité antioxydante de l'anthocyanoside majoritaire (1) du fruit de *T. catappa*

II.1.3.2 Conclusion

Le pigment 1 (cyanidine 3-*O*- β -D-glucopyranoside) identifié dans le fruit de *T. catappa* a déjà été isolé dans les calices des fleurs de *Hibiscus sabdariffa*. [7, 8] D'une teneur de 0,4 g pour 100g de matière sèche, ce composé est plus abondant dans le fruit de *T. catappa* que dans *Hibiscus sabdariffa* (0,31 %). Étant plus actif que la vitamine C, le composé 1 de *T. catappa* serait un antioxydant potentiel.

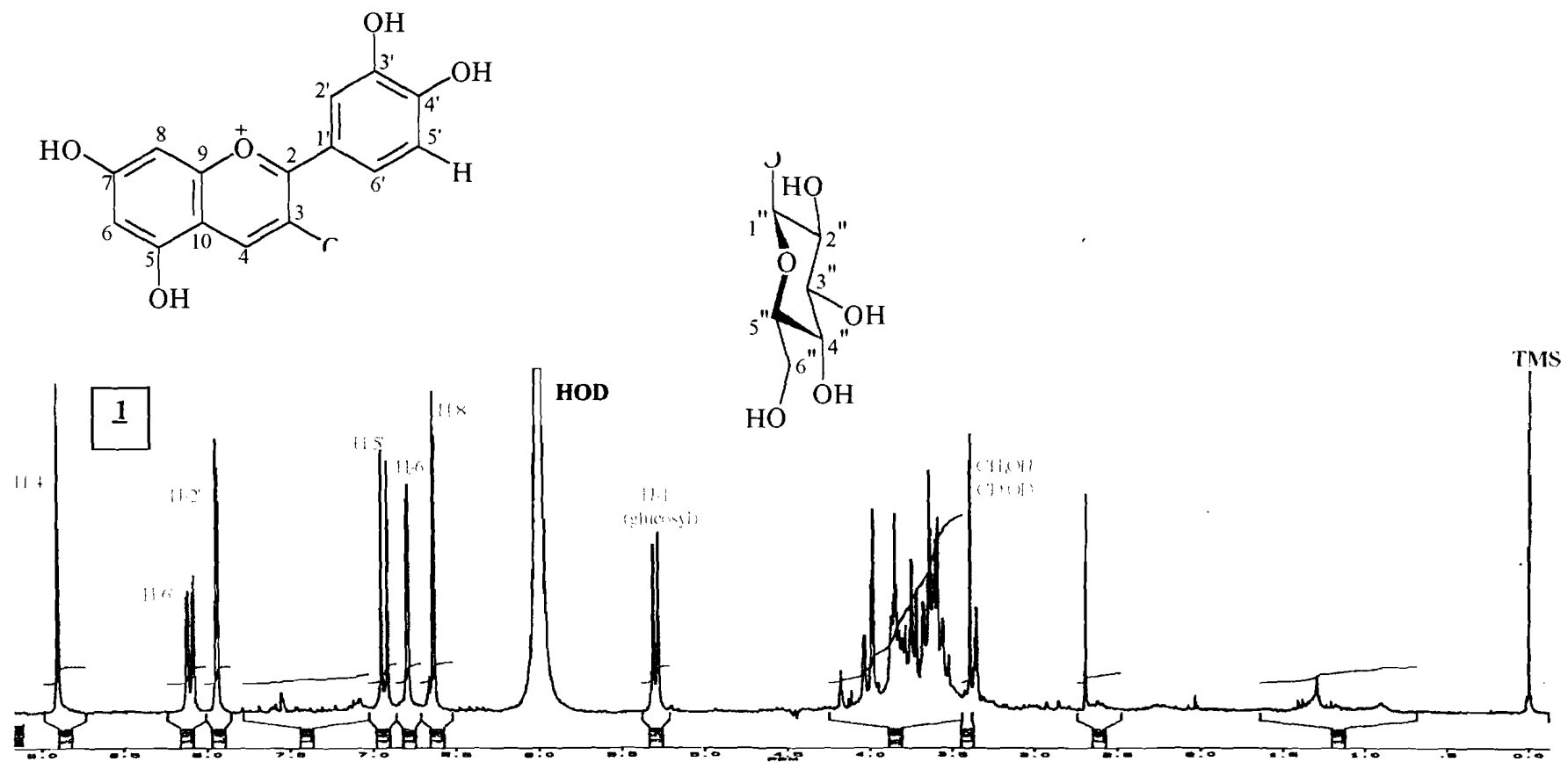


Figure 8. Spectre RMN- ^1H du composé **1** du fruit de *T. catappa*.

3 – Étude d'un diglycoside de la cyanidine isolé de *Adenium obesum*



Planche 2 : *Adenium obesum* en floraison

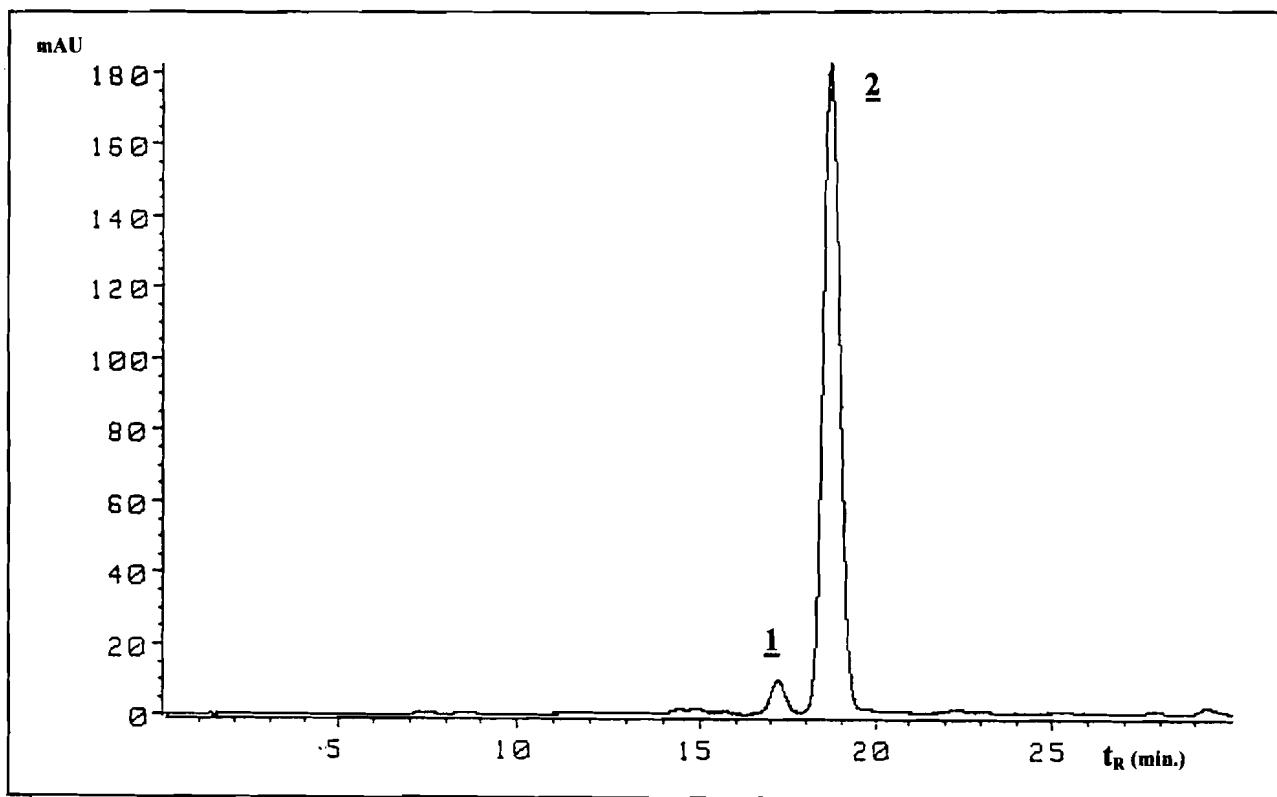
3.1 – Contexte bibliographique

A. obesum est une plante arbustive, haute de 3 à 4 m, de la famille des Apocynaceae dans l'ordre des Apocynales. Le tronc est épais, succulent et renflé à la base. Les feuilles sont opposées, simples, entières et penniverves sans stipules. Les feuilles ne sont présentes qu'en saison pluvieuse. Les inflorescences sont en petites cimes terminales de grandes fleurs roses, campanulées, longues de 5 cm et n'apparaissent qu'en saison sèche lorsque la plante est défeuillée, d'où son nom de "Rose du désert". Rencontrée en Afrique de l'Est en Arabie du Sud, *A. obesum* est l'une des plantes les plus décoratives du Sahel. [35]

Aucune étude ne décrit la présence d'anthocyanes dans les organes de cette plante.

3.2 - Résultats et discussion

La CLHP de l'extrait méthanolique des fleurs de *A. obesum* nous a permis de ne détecter qu'un pigment majoritaire (**2**) [$t_R = 18,7$ mn (97%)] (Fig. 9). Le chromatogramme CLHP présente un deuxième composé minoritaire à $t_R = 17,1$ mn (~2%). Pour l'élution, un gradient linéaire d'un système binaire de solvants à été appliqué : de 20 à 50 % de B dans A (voir partie expérimentale, p. 96) pendant 20 minutes, puis ces conditions finales d'élution ont été maintenues isocraquement pour 10 minutes.



mAU = milli Unité d'Absorbance (Absorbance x 1000)

Figure 9. Chromatogramme CLHP d'un extrait méthanolique des fleurs de *A. obesum*.

Après purification (voir protocole, p. 94), les données R_f en CCM standard, celles du spectre électronique, des temps de rétention en CLHP et CPG ainsi que des produits de l'hydrolyse totale de ces pigments ont été obtenues et consignées

dans le Tableau 3 (p. 22). En spectroscopie de masse (SIMS), nous observons le signal dû à l'ion moléculaire à 595 correspondant à la formule $[C_{27}H_{31}O_{15}]^+$. De plus, l'analyse des fragments secondaires indique bien que $[M-146]$, $[M-308]$ (Tableau 3) correspondent, respectivement, à la perte d'un rhamnosyle $[C_6H_{12}O_4]$ ou d'un rhamnohexosyle $[C_{12}H_{22}O_9]$. En effet, les résultats de la CPG (Tableau 3.) indiquent que le composé comporte des substituants rhamnosyle et galactosyle ; ce qui est confirmé par l'apparition sur le spectre RMN d'un intense doublet à 1,28 ppm (3H) correspondant aux protons du méthyle du rhamnosyle. D'après les données des spectres électroniques et RMN- 1H (Fig. 12, p. 26 et Tableau 4, p. 24), le pigment **2** est un dérivé diglycosylé de la cyanidine. L'observation des déplacements chimiques des protons anomériques (Tableau 4.) et du rapport $\epsilon_{440}/\epsilon_{\max.\text{vis.}}$ suggère que le galactosyle est en position 3 de l'aglycone, le rhamnosyle étant lié au galactosyle par une liaison éther. En outre, un déplacement du déplacement chimique du proton H-2 du galactosyle A (Fig. 10, p.23) vers des champs plus faibles n'a pas été observé, indiquant que l'hydroxyle sur cette position n'est pas substitué par un glycosyle [34, 36-41]. Par ailleurs, la valeur élevée de la constante de couplage observée pour le signal du proton anomérique du galactosyle ($J \sim 7-8$ Hz) suggère que celui-ci est sous la forme β -D-galactopyranose. Par contre, le signal du proton anomérique du rhamnosyle présente une faible valeur de constante de couplage ($J \sim 1,2$ Hz), indiquant ainsi que le rhamnosyle est sous la forme α -L-rhamnopyranose [42-44]. La position exacte du substituant rhamnosyle n'a pas pu être obtenue. Toutefois, la littérature indique que ce substituant est presque toujours en position 4 du sucre qui le précède [42]. Ainsi, le composé est identifié comme étant la cyanidine 3-O-(4-O- α -L-rhamnosyl)- β -D-galactopyranoside

La teneur en pigment, calculée en cyanidine rhamnogalactoside est de 0,6 g pour 100 g de matière sèche.

La mesure de l'activité antioxydante (Fig. 11, p. 25) de ce composé indique que celui-ci est beaucoup moins actif ($IC_{50} = 38,8 \mu\text{g} / \text{ml}$) que la vitamine C ($IC_{50} = 22 \mu\text{g} / \text{ml}$).

3.3 - Conclusion

Les fleurs de *A. obesum* contiennent la cyanidine 3-*O*-(4-*O*- α -L-rhamnosyl)- β -D-galactopyranoside à une teneur de 0,6 g pour 100 g de matière sèche. Les tests antioxydants indiquent que ce composé est peu actif et par conséquent se présente comme un antioxydant peu intéressant. Toutefois, la teneur élevée en pigment fait des fleurs de *A. obesum* une source non négligeable de colorants anthocyaniques. Pour un usage comme colorant alimentaire, des tests toxicologiques sont indispensables compte tenu de la toxicité de cette plante.

Tableau 3. Données spectrales et chromatographiques de l'anthocyanoside majoritaire **2** des fleurs d'*Adenium obesum*.

R _f en CCM (x100)					CLHP	CPG t _R (min)			Données des spectres électroniques (0,1% MeOH-HCl)		SIMS
BAW	BuHCl	HCl 1%	AcHW	EAFW	t _R (mn)	α	β	sucres correspondants	λ _{max} . [logε] en nm	E440/E _{max} . (%) [+AlCl ₃] [†]	m/z
*	*	*	*	**	18,70	12,90	14,42	rhamnose	282 [4,13]	20 [+]	[M] ⁺ 595 [M-146]449
27	12	13	32	33		18,31	19,25	galactose	531 [4,42]		; [M-308]287

* Adsorbant = cellulose microcristalline F254 (0,1 mm ; Merck), BAW = Butan-1-ol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5), phase supérieure, BuHCl = Butan-1-ol - 2 N acide chlorhydrique (1 : 1), phase supérieure, HCl 1% = Acide chlorhydrique conc. - eau (3 : 97), AcHW = Acide acétique - eau (15 : 85); ** Adsorbant = silice 60 (0,1 mm ; Merck), EFW = Acétate d'éthyle - acide formique - acide acétique - eau (100 : 11 : 11 : 26)^{18, 19, 30, 32}; † Addition de 2-3 gouttes de chlorure d'aluminium : + = effet bathochrome ; 0 = aucun d'effet.

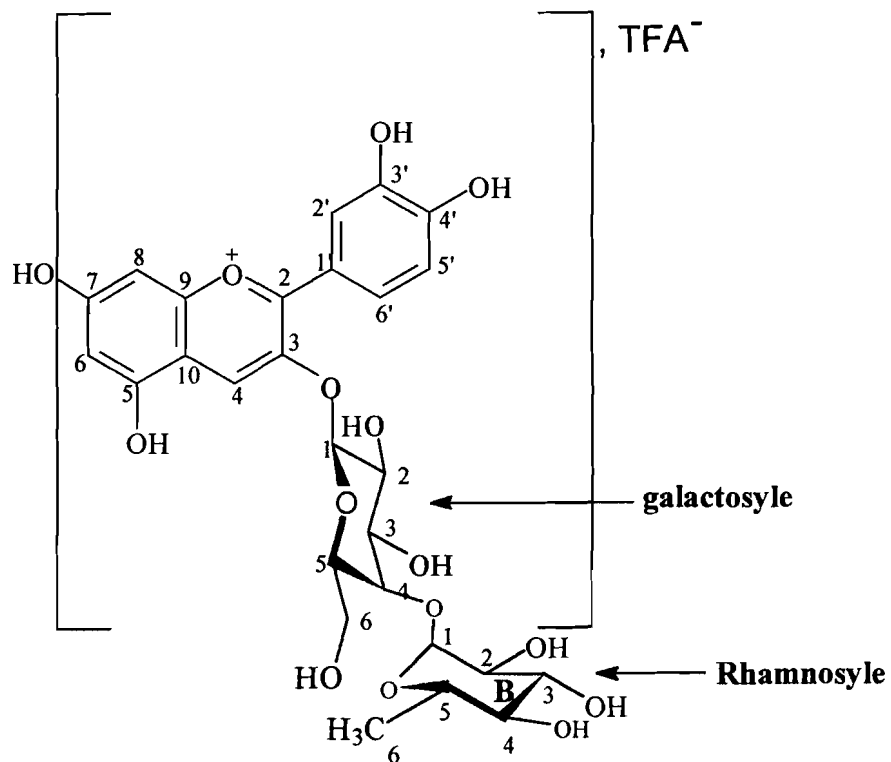


Figure 10. Structure complète de cyanidine 3-O-(4-O- α -L-rhamnosyl)- β -D-galactopyranoside (composé 2) des fleurs d'*Adenium obesum*.

Tableau 4. Données RMN-¹H de l'anthocyanoside majoritaire(2) des fleurs d'*Adenium obesum*.

	<u>2</u> δ (ppm) J (Hz)
Aglycone	Cyanidine
H4	8,89 ; s
H6	6,85 ; d 1,3
H8	6,67 ; d 1,9
H2'	8,04, d 2,3
H5'	6,99 ; d 8,8
H6'	8,18 ; dd 2,3 ; 8,8
sucre A*	<i>β</i> -D-galactopyranosyle
H1	5,26 ; d 7,7
H2	4,07 ; d 7,7
H3, H4, H5, H6a et H6b	3,36 ~ 4,05
sucre B*	<i>α</i> -L-rhamnopyranosyle
H1	4,71 ; d 1,3
H2, H3, H4, H5	3,36 ~ 4,05
<u>CH</u> ₃	1,28 ; d 6,2

* Attribution faite d'après les constantes de couplage et les données de la littérature [33, 27-29].
 Multiplicité : s = singulet, d = doublet, dd = double doublet.

Concentration (ppm)	DO _{517 nm}
0	0,94
3,37	0,87
6,73	0,83
10,04	0,77
13,46	0,73
16,83	0,68
IC ₅₀ =	38,8 µg / ml

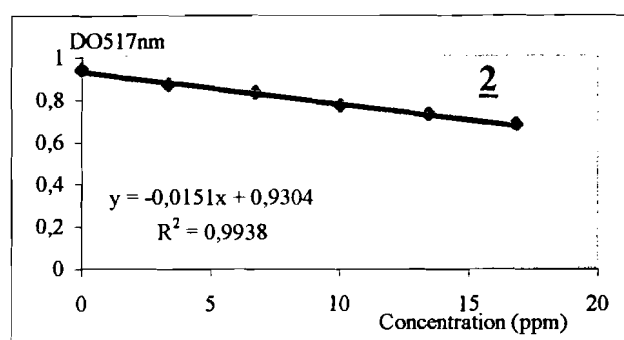


Figure 11. Mesure de l'activité antioxydante de l'anthocyanoside majoritaire (2) isolé des fleurs d'*Adenium obesum*.

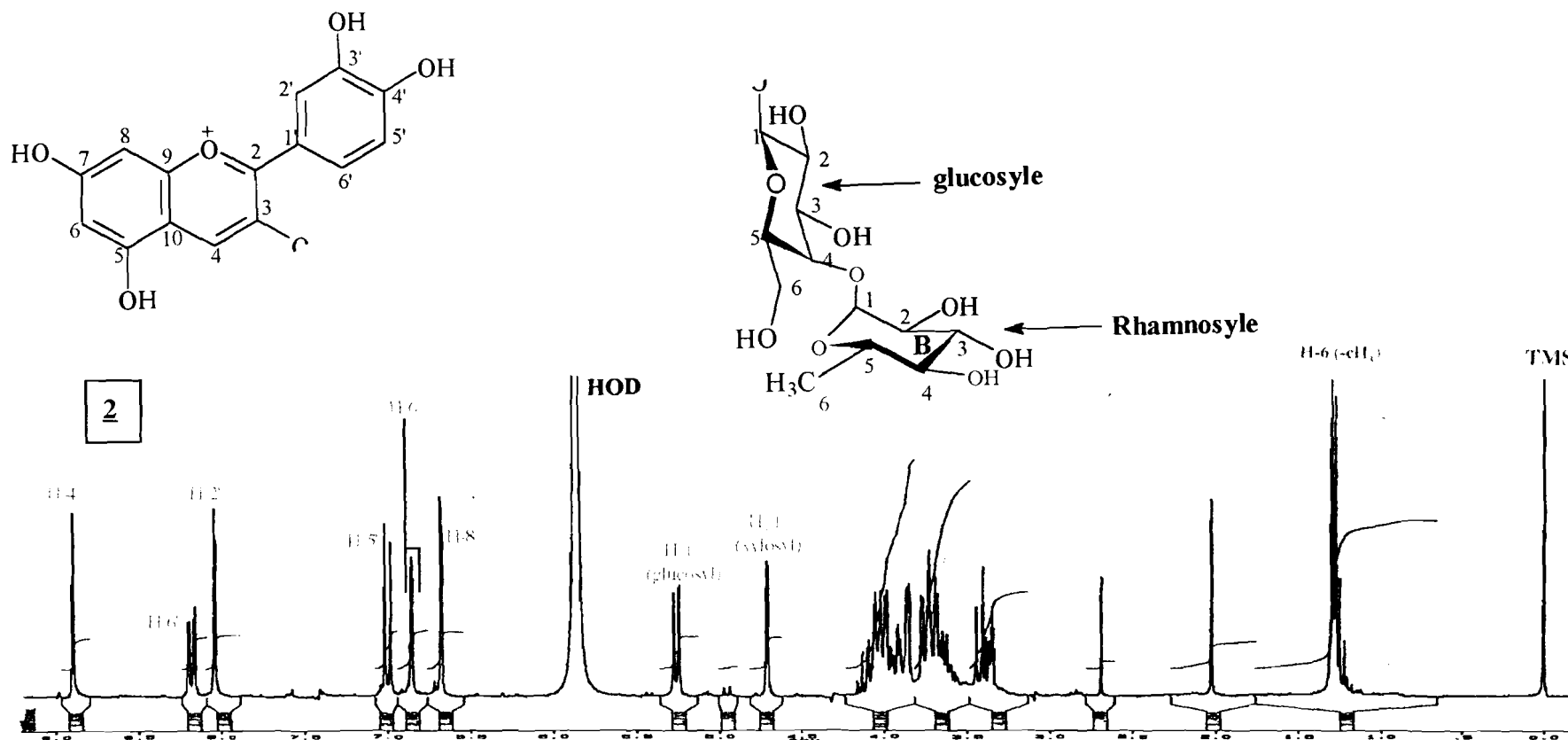


Figure 12. Spectres RMN-¹H du composé **2** isolé des fleurs de *A. obesum*

4 – Étude de quatre anthocyanosides isolés des fleurs de *Jatropha integrerrima*



Planche 3 : *Jatropha integrerrima* en floraison

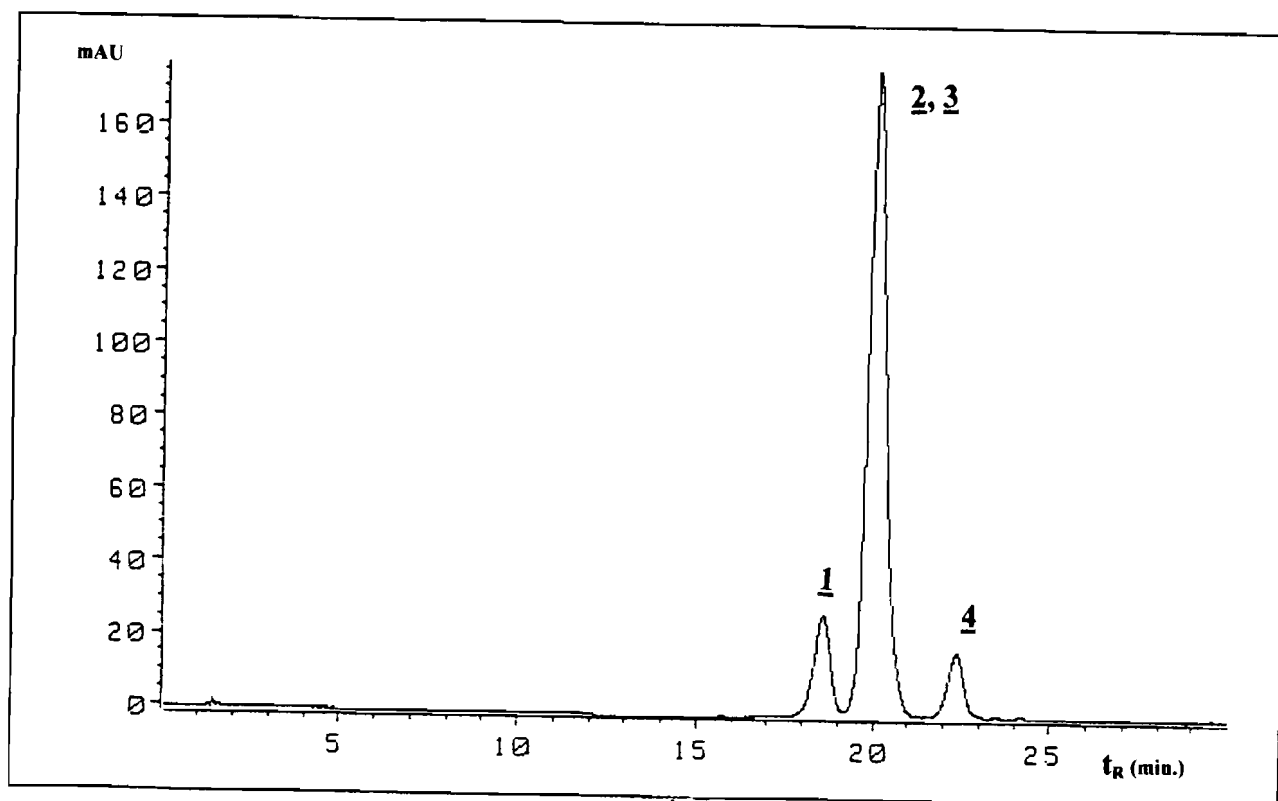
4.1 – Contexte bibliographique

J. integrerrima est une plante arbustive de la famille des Euphorbiaceae, dans l'ordre des Euphorbiales ^[44]. En permanente floraison, *J. integrerrima* est une plante ornementale d'origine cubaine. Les anthocyanes de cette plante seraient encore inconnues.

4.2 - Résultats et discussions

La CLHP et la spectrométrie électronique appliquées aux extraits méthanolique de *J. integrerrima* ont permis d'identifier 4 pigments (1, 2, 3 et 4) (Fig. 13, p.29). Pour l'élution, un gradient linéaire de système binaire de solvants à été appliqué : de 20 à 50 % de B dans A (voir partie expérimentale, p. 96) pendant 20 minutes, puis ces conditions finales d'élution ont été maintenues isocratiquement pendant 10 minutes.

Après purification (cf. protocole, p. 95), les données R_f en CCM standard, du spectre électronique, les temps de rétention en CLHP et CPG ainsi que les produits de l'hydrolyse totale des 4 pigments sont obtenus et consignés dans le Tableau 5. Les spectres de masse (SIMS) de 1, 2, 3 et 4 font apparaître leur ion moléculaire à 449, 595, 433 et 579 respectivement, correspondant aux formules moléculaires $[C_{21}H_{21}O_{11}]^+$, $[C_{27}H_{31}O_{15}]^+$, $[C_{21}H_{21}O_{10}]^+$ et $[C_{27}H_{31}O_{14}]^+$. De plus, l'analyse des fragments secondaires indique bien que [M-146], [M-162] et [M-308] correspondent, respectivement, à la perte d'un rhamnosyle $[C_5H_8O_4]$, d'un hexosyle (glucosyle, galactose, etc.) $[C_6H_{10}O_5]$ et dihexosyle $[C_{11}H_{18}O_9]$; ce qui est en parfait accord avec les résultats de la CPG (Tableau 5.).



mAU = milli Unité d'Absorbance (Absorbance x 1000)

Figure 13. Chromatogramme CLHP d'un extrait méthanolique des fleurs de *J. integririma*.

Le seul sucre détecté pour 1 et 3 correspond au glucose, tandis que les sucres de 2 et 4 correspondent aux rhamnose et glucose. D'après les données des spectres électroniques et RMN-¹H (Fig. 16, p. 36 et Tableau 5 & 6, p. 32 & 34), 1 et 2 sont, respectivement, des dérivés monoglycosylé et diglycosylés de la cyanidine, tandis que 3 et 4 sont, respectivement, des dérivés monoglycosylés et diglycosylés de la pélargonidine. L'observation des déplacements chimiques des protons anomériques (Tableau 6) et des rapports $\epsilon_{440}/\epsilon_{\max.\text{vis.}}$ suggère que les

lié au glucosyle par une liaison éther. Par ailleurs, les valeurs élevées des constantes de couplage observées pour les signaux des protons anomériques des sucres observés vers 5,3 ppm ($J \sim 7-8$ Hz) suggèrent que ces derniers soient sous la forme β -D-glycopyranose. Les faibles valeurs de constantes de couplage des protons anomériques des sucres vers 4,7 ppm indiquent que ces derniers sous la forme α -L-glycopyranose presque toujours attribuée aux substituants rhamnosyles. En outre, un déplacement du signal du proton H-2 du glucosyle A de 2 et 4 (Fig. 16, p. 36) vers des champs plus faibles n'a pas été observé, ce qui suggère que le rhamnosyle ne soit pas lié en position 2 du glucosyle [34, 36-41]. Par contre, une légère augmentation des déplacements chimiques des protons H_{6a} des glucosyles de 2 et 4 est observée par rapport à leurs homologues libres ; ceci indiquerait que les rhamnosyles sont liés en position 6 des glucosyles, cela constitue des cas rarement observés.

Ainsi, les composés 1, 2, 3 et 4 sont identifiés comme étant, respectivement, la cyanidine 3-*O*- β -D-glycopyranoside, la cyanidine 3-*O*-(6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glycopyranoside, la pélargonidine 3-*O*- β -D-glycopyranoside et la pélargonidine 3-*O*-(6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glycopyranoside (Fig. 14, p. 33).

La teneur en pigment, estimée en cyanidine rhamnosylglucoside (composé majoritaire 2, >75%), est de 2,4 g pour 100 g de matière sèche, ce qui est assez élevé.

La mesure de l'activité antioxydante (Fig. 15, p. 35) montre que le composé 1 est légèrement moins actif ($IC_{50} = 27,5$ μ g / ml) que le composé 2 ($IC_{50} = 23,6$ μ g / ml) qui possède une activité voisine de celle de la vitamine C. Les activités antioxydantes des composés 3 et 4 n'ont pas pu être mesurées par manque de produits en quantité suffisante.

4.3 - Conclusion

Jatropha integrerrima contient quatre anthocyanosides : la cyanidine 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**), la cyanidine 3-*O*-(6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside(**2**), la pélargonidine 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**3**) et la pélargonidine 3-*O*-(6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4**). Ces composés ont déjà été isolés dans d'autres plantes ^[42]. La mesure des activités antioxydantes révèle que le composé **1** de *J. integrerrima* pourrait être un antioxydant potentiel ; ce qui est d'ailleurs en accord avec les résultats obtenus pour les composés **1** du fruit de *T. catappa* (page 9) et **4** des calices de *H. sabdariffa* ^[8] déjà décrites. En effet ces composés sont identiques. Par contre le composé **2** de *J. integrerrima* est peu actif. Les fleurs de *J. integrerrima* constituent cependant une source potentielle de colorants anthocyaniques à cause de leur teneur en anthocyanes (2,4 g / 100 g de matière sèche).

Tableau 5. Données spectrales et chromatographiques des anthocyanosides des fleurs de *J. integrerrima*.

Anthocyanosides (dénomination)	R _f en CCM (x100)					CLH P T _R (mn)	CPG t _R (min)			Données des spectres électroniques (0,1% MeOH-HCl)		SIMS m/z
	BAW *	BuHCl *	HCl 1% *	AcHW *	EAFW **		α	β	sucres correspondant	λ _{max} . [logε] en nm	E ₄₄₀ /E _{max} . (%) [+AlCl ₃] [†]	
<u>1</u>	29	12	05	17	43	18,50	19,01	21,00	glucose	281 [4,33] 528 [4,61]	20 [+]	[M] ⁺ 449 ; [M-162]287
<u>2</u>	29	14	14	34	33	20,00	12,96 19,00	14,45 20,97	rhamnose glucose	282 [4,16] 530 [4,43]	20 [+]	[M] ⁺ 595 ; [M-146]449 [M-308]287
<u>3</u>	40	22	12	29	48	20,00	18,97	20,94	glucose	269 [---] 433 [---] 510 [---]	3 7[0]	[M] ⁺ 433 ; [M-162]271
<u>4</u>	38	22	21	45	46	22,30	13,00 19,03	14,50 21,01	rhamnose glucose	270 [4,16] 433 [3,94] 511 [4,37]	37 [0]	[M] ⁺ 579 ; [M-146]433 [M-308]287

* Adsorbant = cellulose microcristalline F254 (0,1 mm ; Merck), BAW = Butan-1-ol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5), phase supérieure, BuHCl = Butan-1-ol - 2 N acide chlorhydrique (1 : 1), phase supérieure, HCl 1% = Acide chlorhydrique conc. - eau (3 : 97), AcHW = Acide acétique - eau (15 : 85); ** Adsorbant = silice 60 (0,1 mm ; Merck), EFW = Acétate d'éthyle - acide formique - acide acétique - eau (100 : 11 : 11 : 26)^[18, 19, 30, 32]; † Addition de 2-3 gouttes de chlorure d'aluminium : + = effet bathochrome ; 0 = aucun d'effet.

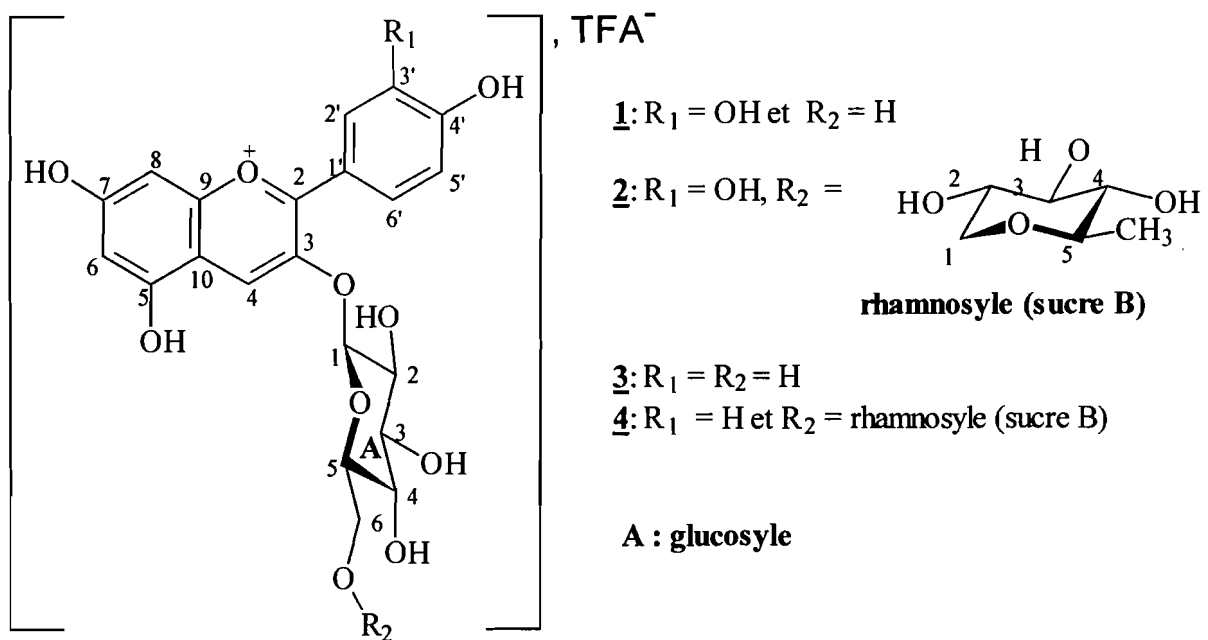


Figure 14. Structure complète des composés 1, 2, 3 et 4. isolés des fleurs de *J. integrerrima*

Tableau 6. Données RMN-¹H des anthocyanosides des fleurs de *J. integuerrima*.

	<u>1</u> δ (ppm) J (Hz)	<u>2</u> δ (ppm) J (Hz)	<u>3</u> δ (ppm) J (Hz)	<u>4</u> δ (ppm) J (Hz)
Aglycones	Cyanidine	Cyanidine	Pélargonidine	Pélargonidine
H4	9,01 ; s	8,91 ; s	9,10 ; s	9,01 ; s
H6	6,88 ; d 1,3	6,80 ; d 1,3	6,93 ; d 1,3	6,93 ; d 1,3
H8	6,68 ; d 1,9	6,70 ; d 1,9	6,71 ; d 1,9	6,72 ; d 1,9
H2'	8,06 ; d 2,3	8,03 ; d 2,2	8,61 ; d 9,1	8,60 ; d 9,0
H3'			7,01 ; d 9,1	7,08 ; d 9,0
H5'	7,02 ; d 8,7	7,02 ; d 8,7	7,01 ; d 9,1	7,08 ; d 9,0
H6'	8,21 ; dd 2,3 ; 8,7	8,21 dd 2,2 ; 8,7	8,61 ; d 9,1	8,60 ; d 9,0
sucre A*	β-D-glucopyranosyle			
H1	5,31 ; d 7,6	5,28 ; d 7,5	5,29 ; d 7,6	5,27 ; d 7,6
H2, H3, H4, H5, H6b	3,4 ~ 3,8	3,40 ~ 4,00	3,40 ~ 3,80	3,40 ~ 3,80
H6a	3,98 ; d 10,4	4,10 ; d 10,35	3,95 ; 12,4	4,10 ; d 10,00
sucre B*	α-L-rhamnopyranosyle		α-L-rhamnopyranosyle	
H1		4,71 ; d 1,0		4,70 ; d 1,2
H2, H3, H4, H5		3,50 ~ 4,00		3,50 ~ 4,00
CH ₃		1,2 ; d 6,2		1,2 ; d 6,2

* Attribution faite d'après les constantes de couplage et les données de la littérature [33, 34, 37, 45, 46].
 Multiplicité : s = singulet, d = doublet, dd = double doublet.

Concentration (en ppm)	<u>1</u>	<u>2</u>
	DO _{517nm}	
0	0,89	0,9
3,37	0,77	0,81
6,73	0,65	0,74
10,04	0,58	0,67
13,46	0,6	0,61
16,83	0,46	0,56

$IC_{50} = 23,6 \mu\text{g} / \text{ml} ; 27,5 \mu\text{g} / \text{ml}$

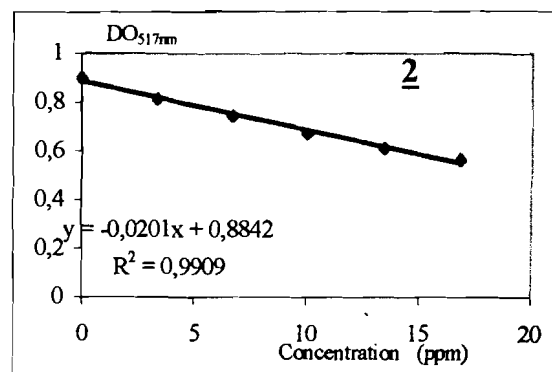
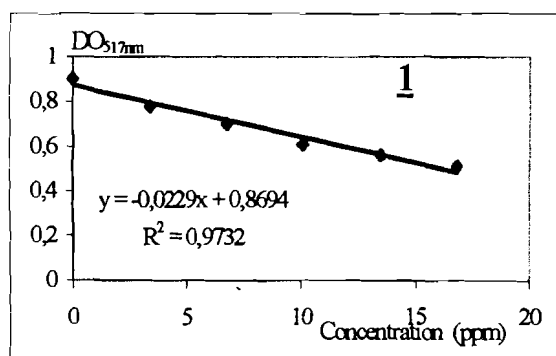


Figure 15. Données des activités antioxydantes des anthocyanosides 1 et 2 des fleurs de *J. integrerrima*.

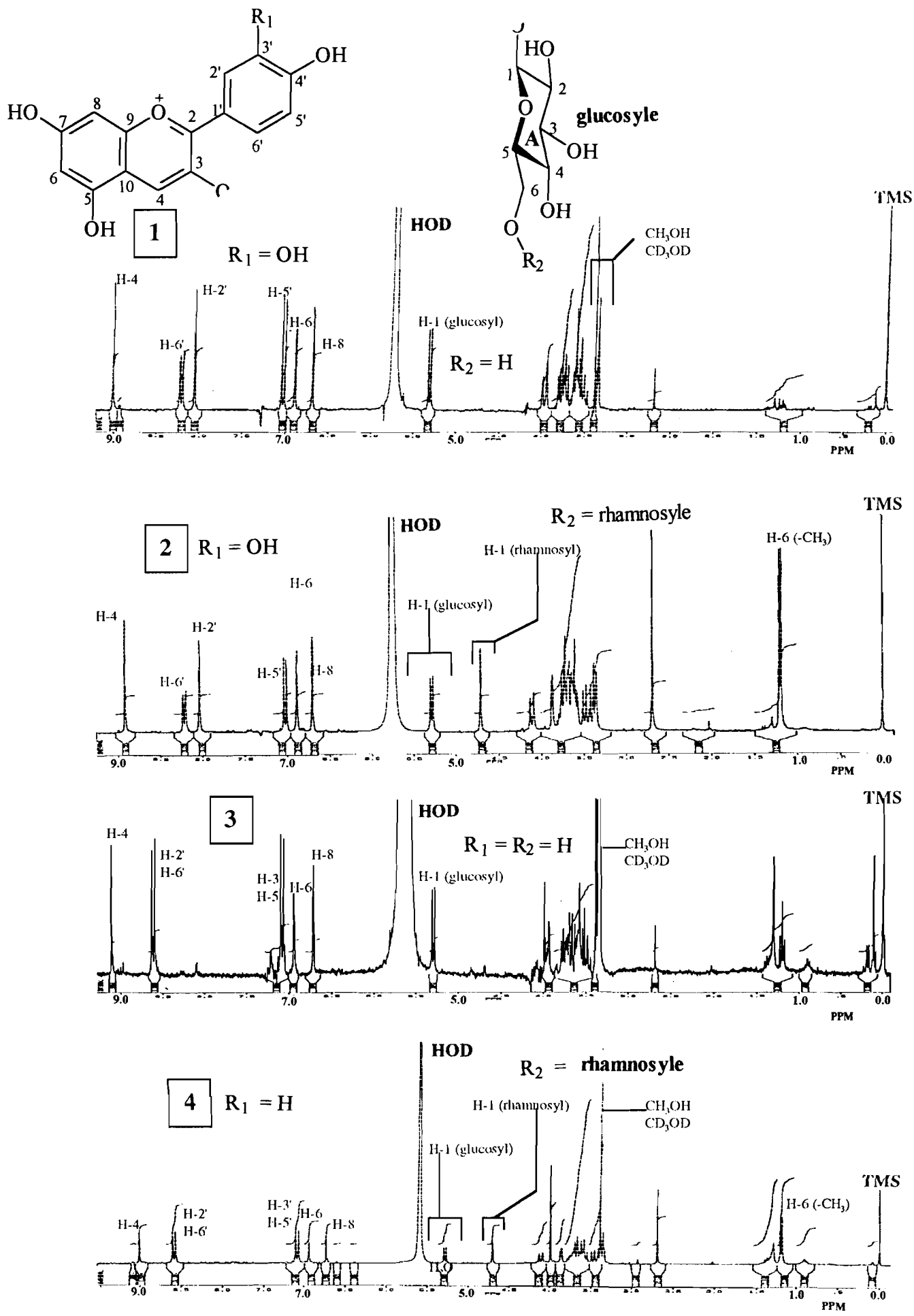


Figure 16. Spectres RMN-¹H caractéristiques de 4 pigments fleurs de *J. integerrima*.

5- Étude de quatre nouvelles anthocyanes acylées de *Ipomoea asarifolia*



Planche 4 : *Ipomoea asarifolia* en floraison

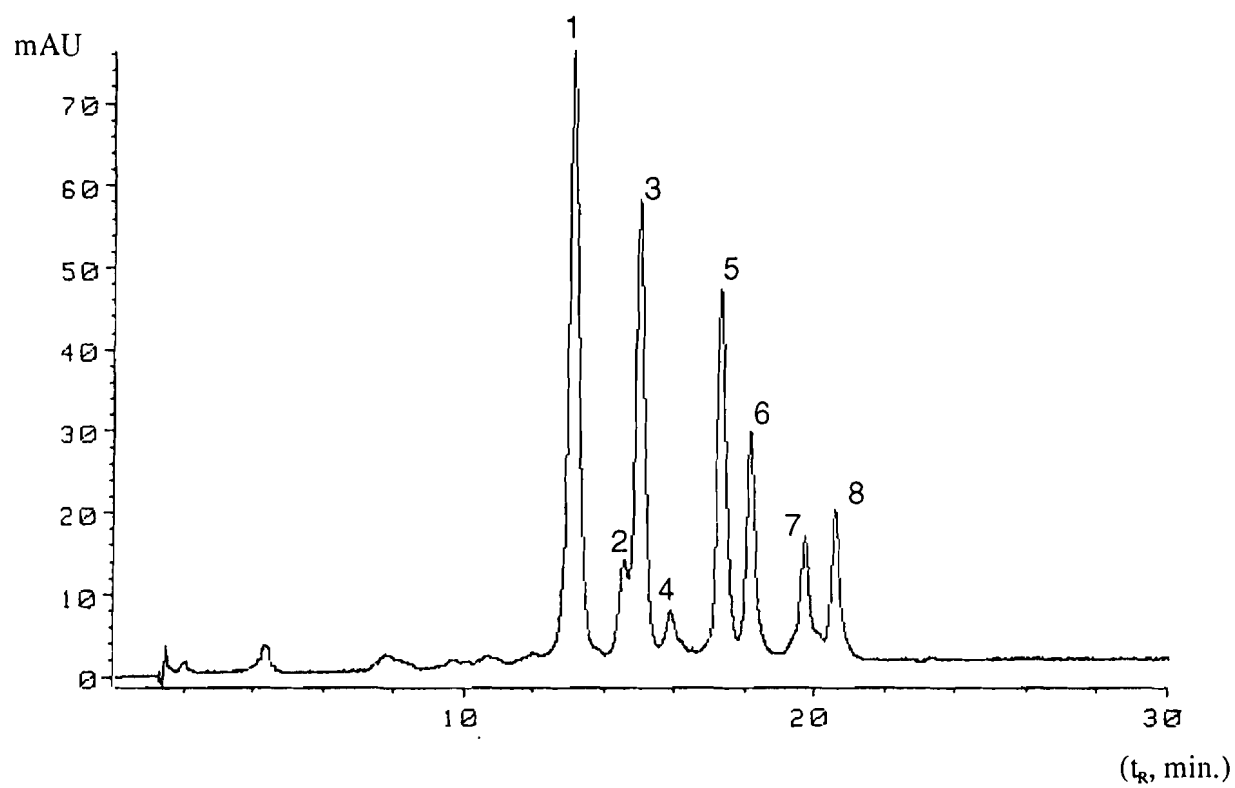
5.1 – Contexte bibliographique

I. asarifolia est une plante herbacée rampante de la famille des Crotovulaceae, dans l'ordre des Euphorbiales. Elle émet des racines adventives au niveau des différents noeuds. Le long pétiole porte un limbe émerginé au sommet et porte une paire de glande à la base. Les fleurs sont groupées en simule axillaire ; la corolle est de couleur blanc-violacée. Le fruit est en capsule et la graine est noire à maturité.

Les travaux antérieurs sur des espèces de la même famille telles que *I. batatas* ^[33], *I. cairica* ^[47, 48], *I. fustilosa* ^[49], décrivent, dans les fleurs, la présence d'anthocyanes acylées assez complexes qui sont des dérivés de la cyanidine, de la paeonidine et de la pétunidine.

5.2 - Résultats et discussions

Les pétales des fleurs, fraîchement collectées et lyophilisées, ont été extraites au méthanol acide. Un "screening" des anthocyanes sur le concentré de l'extrait brut a été effectué par CLHP. Des huit pigments qui ont été détectés (Fig. 17) quatre anthocyanes majoritaires [1, $t_R = 12,34$ mn, 88% ; 3, $t_R = 14,70$ mn, 47%), 5, $t_R = 16,72$ mn, 9% ; 8, $t_R = 20,20$ mn, 4%)] montrant une absorption aux environs de 530 nm ont été purifiées et identifiées. Après des CC Successives sur Amberlite XAD-7, Sephadex LH-20, gel de silice en phase inverse (RP-8) et CCM préparative sur silice (voir protocole, p. 94), ces pigments ont été obtenus sous la forme de sels de trifluoroacétates d'anthocyanes. Les quatre autres composés (2, 4, 6 et 7) n'ont pu être isolés en quantité suffisante.



mAU = milli Unité d’Absorbance (Absorbance x 1000)

Figure 17. Chromatogramme CLHP d’un extrait méthanolique des fleurs de *I. asarifolia*.

5.2.1 – Étude du composé 1

Le spectre électronique du composé 1 montre (Fig. 19, p. 43), en plus de la bande d'absorption vers 530 nm, deux bandes d'absorption vers 295 et 329 nm correspondant aux résidus d'acides phénoliques ^[18] (Tableau 7, p. 82). Le rapport E_{acyl}/E_{vis} indique la présence de deux acides phénoliques. Le rapport E_{440}/E_{vis} comparé à celui de la cyanidine suggère que la position 5 de l'aglycone soit substituée (cf. Tableau 7) ^[18, 30, 50]. Par addition de chlorure d'aluminium, un déplacement bathochrome du maximum d'absorption dans le visible a été observé, indiquant ainsi la présence de groupements hydroxyles vicinaux libres sur l'anthocyanidine (Tableau 7). Après hydrolyse acide, 1 a libéré le glucose qui a été identifié par CPG sous forme de TMSSi. Les CCM analytiques des produits obtenus après hydrolyse alcaline ont abouti à l'identification de l'acide caféique. Ces résultats indiquent que cette dernière molécule d'acide phénolique estérifie un substituant glucosyle et est sans doute en bout de chaîne ^[29, 51]. Les spectres de masse (ESI-MS) montrent un ion moléculaire à m/z 1097 (100%) correspondant à la formule moléculaire $C_{51}H_{53}O_{27}$ et les pics des fragments à m/z 935 [M-caféyle]⁺, 773 (1%) [M-(caféyle) x 2 ou caféylglucosyle], 611 (2%) [M-(caféyle) X 2 -glucosyle]⁺, 449 (25%) [M-(caféylglucosyle) x 2]⁺, 287 (54%) [M-(caféyle) x 2 -(glucosyle) x 3]⁺ (Fig. 20, p. 44 et Tableau 7, p. 82). La spectrométrie RMN incluant les expériences "TOCSY-1D (Fig. 22, p. 46), DIFFNOE (Fig. 23, p. 47), DQF-COSY (Fig. 24, p. 48), HMBC et les mesures RMN ¹³C (Fig. 25, p. 49) ont permis une identification complète de la structure (Tableau 8, p. et Fig. 25.). Sur les spectres RMN ¹H, les signaux des protons du noyau cyanidine ont été clairement détectés à δ (ppm) 8,84 (H-4), 7,92 (H-2'), 8,19 (H-6'), 7,00 (H-5'), 6,85 (H-6) et 6,83 (H-8) (Fig. 21, p. 45). Deux paires de doublets apparaissent à δ (ppm) (5,94 ; 7,18) et (5,75 ; 7,00) avec un large couplage ($J \sim 16$ Hz), confirmant ainsi la configuration *E* des protons oléfiniques des molécules d'acides phénoliques. Presque tous les protons

des sucres apparaissent entre δ 3,0 et 5,5 ppm dans un massif. Toutefois, les trois doublets caractéristiques correspondant aux protons H-1 des glucoses A, B et C sont clairement observés à δ 5,36, 4,81 et 5,16 ppm. Leur configuration β est confirmée par la forte valeur de leur constante de couplage ($J \sim 7-8$ Hz). Les spectres "TOCSY" obtenus par irradiation sélective des signaux des protons H-1 des glucosyles ont permis de confirmer l'appartenance de chaque proton méthylénique des glucoses A, B et C. En outre, les valeurs des δ des signaux des protons des glucosyles A et B suggèrent que les acyles soient substitués en position 6 de ces glucosyles [34, 36-41]. Pour déterminer les positions de liaison des sucres, des expériences de corrélation "NOEDIFF" ont été effectuées. La corrélation entre H-1 du glucose A et H-4 de l'aglycone indique que le glucose A est lié en position 3. De plus, l'irradiation du signal de H-1 du glucose C conduit à un effet NOE négatif de H-6 de l'aglycone, confirmant la liaison d'un glucosyle (glucose C) sur l'hydroxyle en position 5 de la cyanidine. L'irradiation du signal de H-1 du glucose B n'aboutit à aucun effet NOE. Les expériences HMBC ont permis d'observer les corrélations entre H-1 du glucosyle B et C-2 du glucosyle A, confirmant une liaison 1- \rightarrow 2 interglucosidique entre les glucosyles A et B. En outre, le déplacement du signal du proton H-2 du glucosyle A vers des champs faibles confirme que la position 2 du glucosyle A est substitué. Les méthodes "DQF-COSY" et "HMBC" ont été des outils indispensables pour l'attribution des déplacements chimiques des protons et carbones, ainsi que pour la détermination des positions de liaison des acyles I et II, respectivement, aux glucoses A et B. De même, ces méthodes ont permis d'observer le léger déplacement des signaux des protons de l'acyle I vers des champs plus faibles par rapport à ceux de l'acyle II. Ainsi, les deux carbones des carbonyles apparaissent clairement à δ 169,0 (acyle I) et 168,6 (acyle II) (Tableau 8, p. 83). H- α et H- β de l'acyle I sont corrélés aux mêmes carbones [C-1 (δ 127,3) et -C=O (δ 168,6)]. En outre, H- α est corrélé à C-6 du glucose A.

L'acyle I est donc lié à l'hydroxyle en position 6 du glucose A tandis que le second acyle est lié en position 6 du glucose B. Ainsi, le composé **1** des fleurs de *Ipomoea asarifolia* a été identifié comme étant la cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)]-(6-*O*-*E*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside. (Fig. 18)

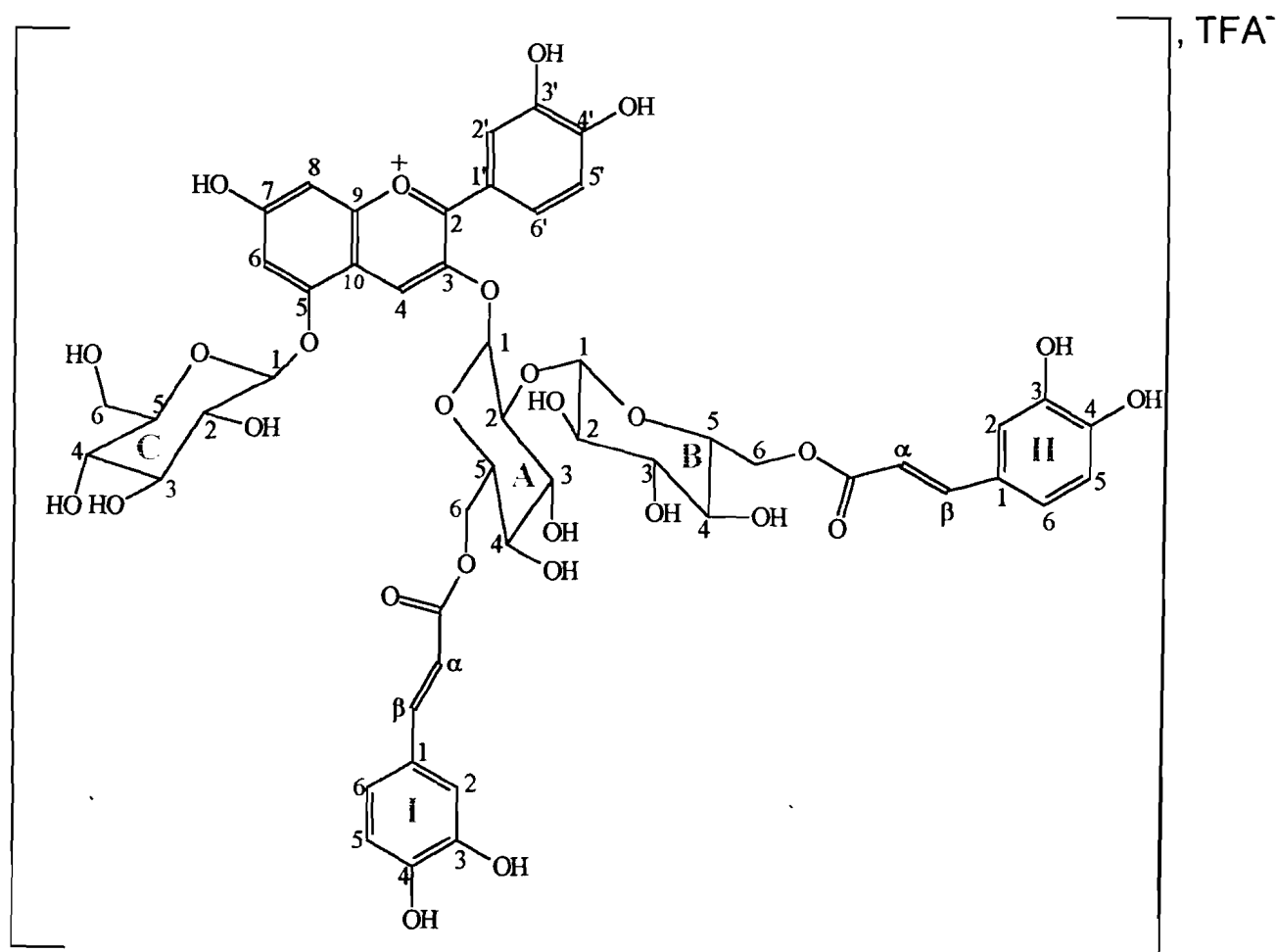


Figure 18. Structure complète du composé **1** isolé des fleurs de *I. asarifolia*.

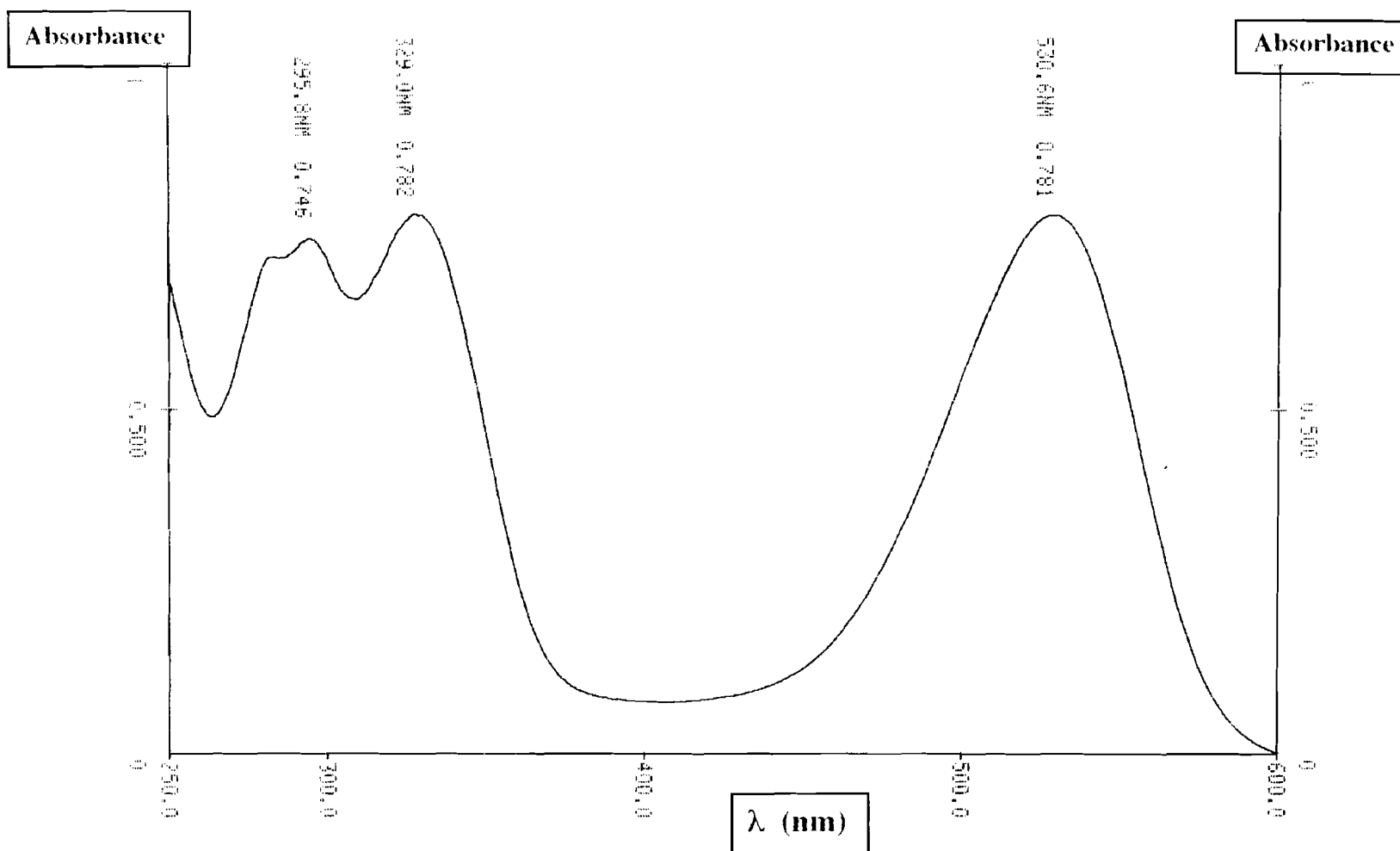


Figure 19. Spectre électronique du composé **1** des fleurs de *I. asarifolia*.

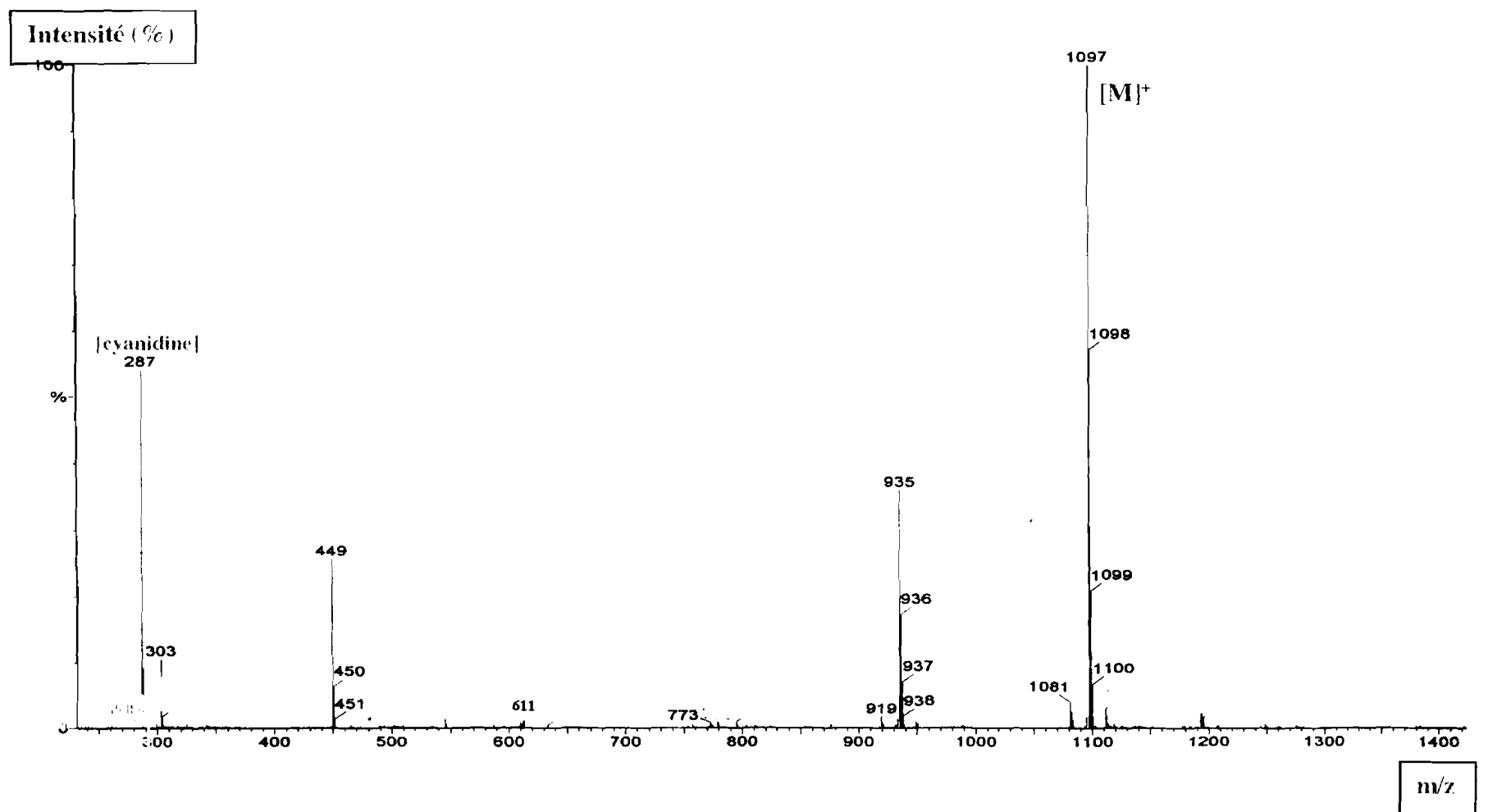


Figure 20. Spectre de masse du composé 1 des fleurs de *I. asarifolia*.

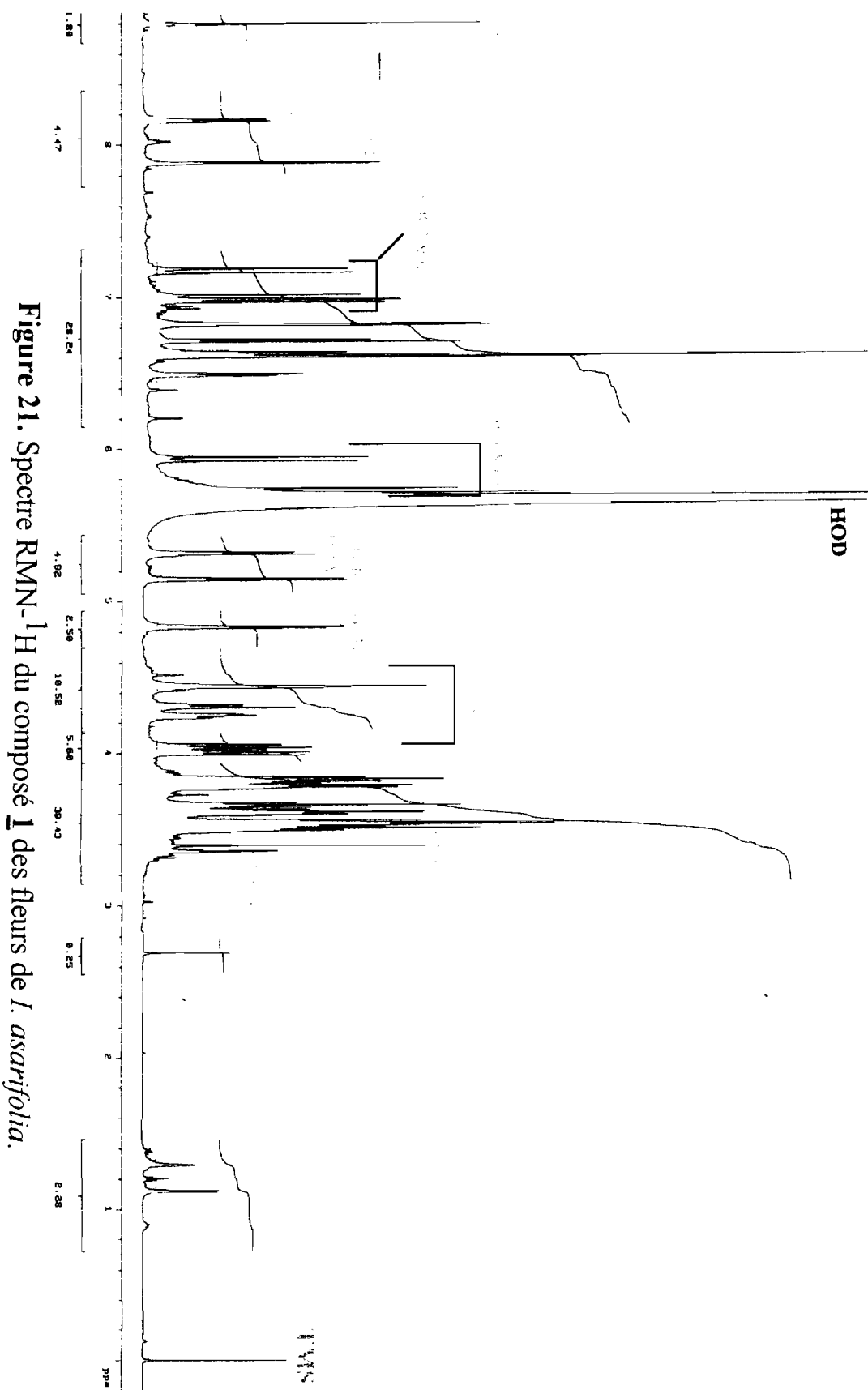


Figure 21. Spectre RMN- ^1H du composé **1** des fleurs de *I. asarifolia*.

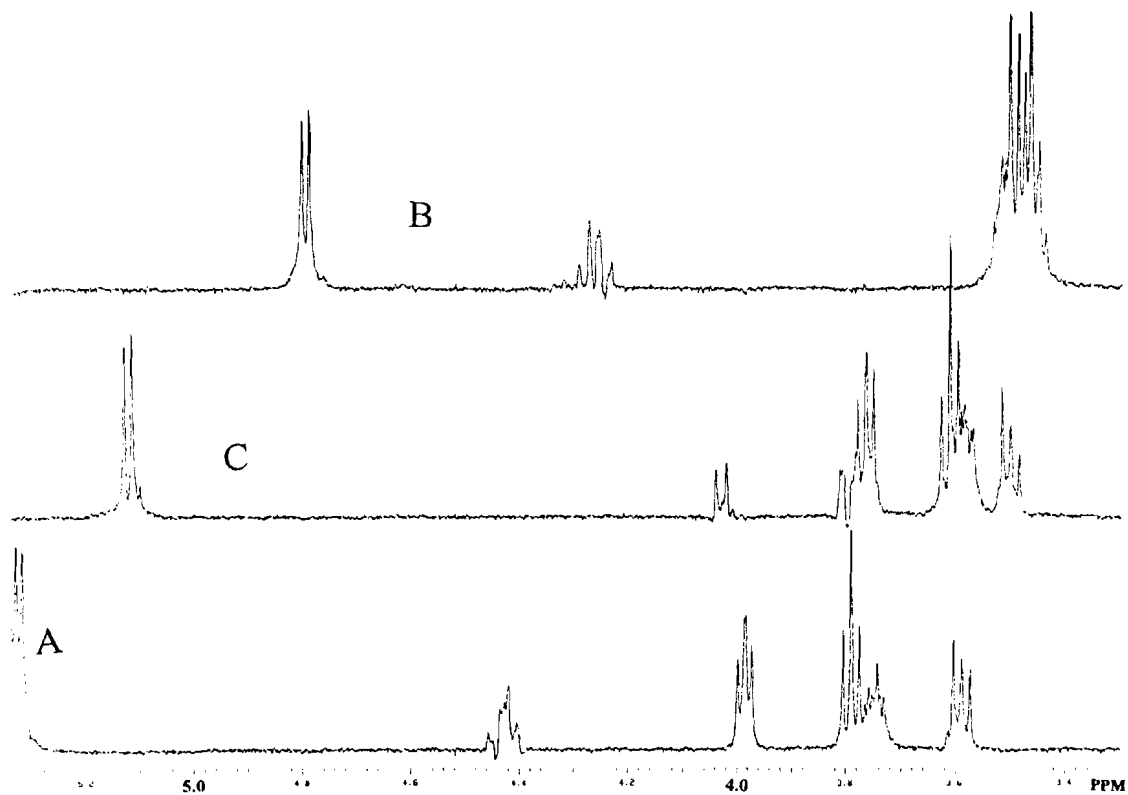


Figure 22. Spectres RMN-TOCSY 1D du composé 1 des fleurs de *I. asarifolia*. Irradiation selective des signaux des protons anomériques (H-1A, H-1B, H-1C) des glucosyles

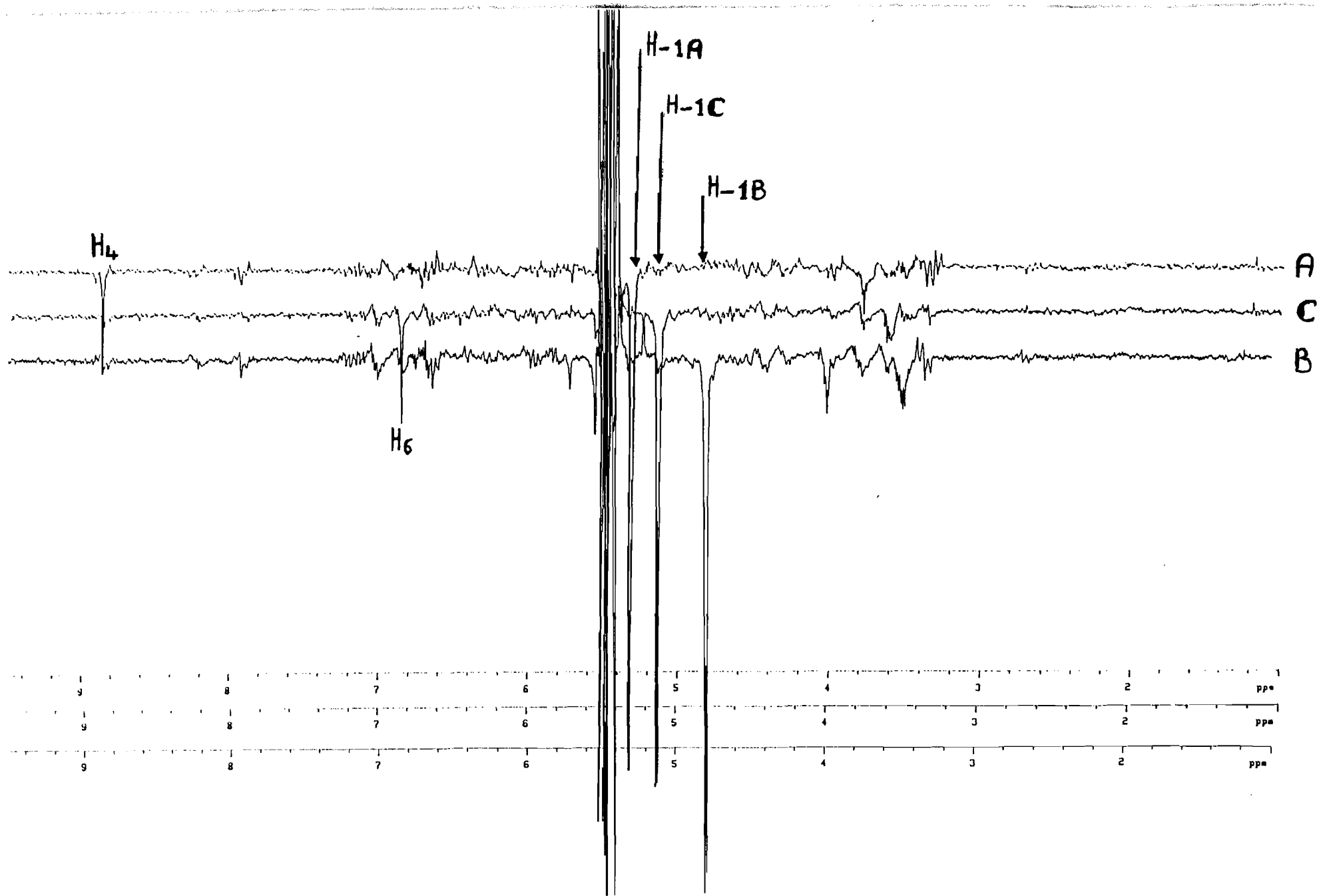


Figure 23. Spectres RMN des effets overhauser (NOEDIFF) du composé **1** des fleurs de *I. asarifolia*. Irradiation selective des signaux des protons anomériques (H-1A, H-1B, H-1C) des glucosyles

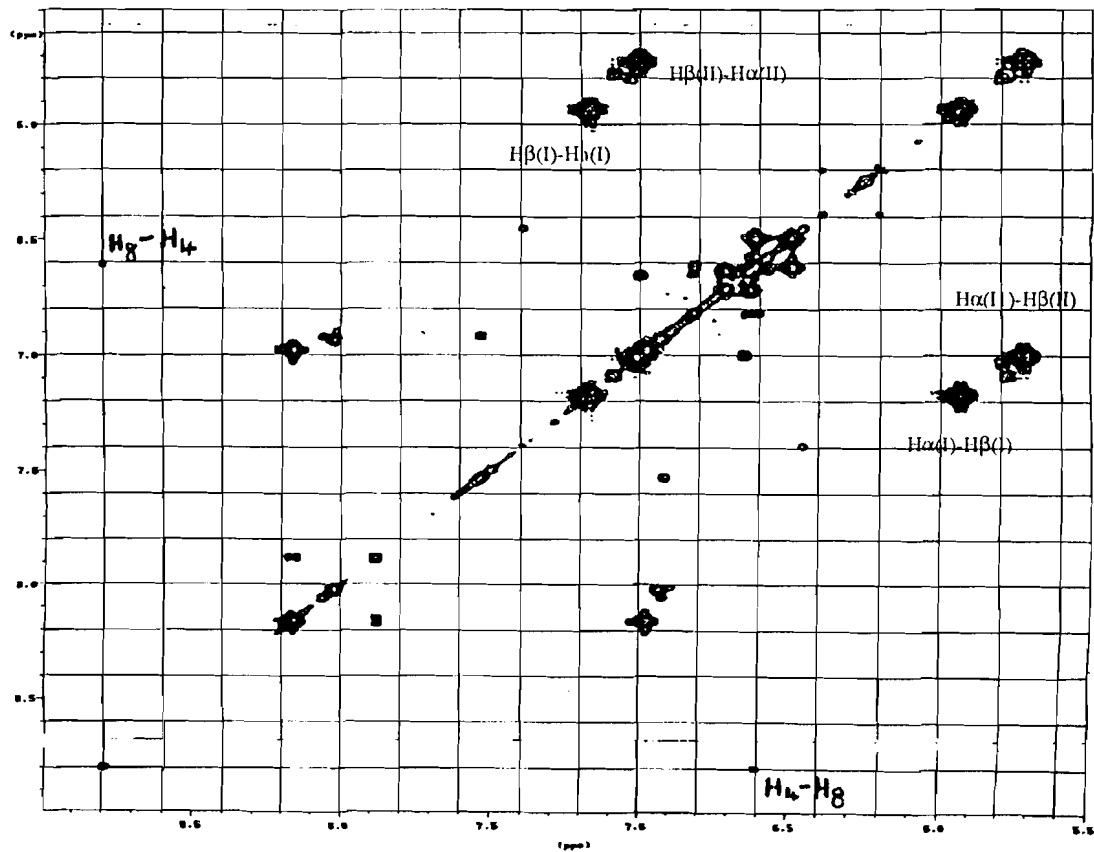
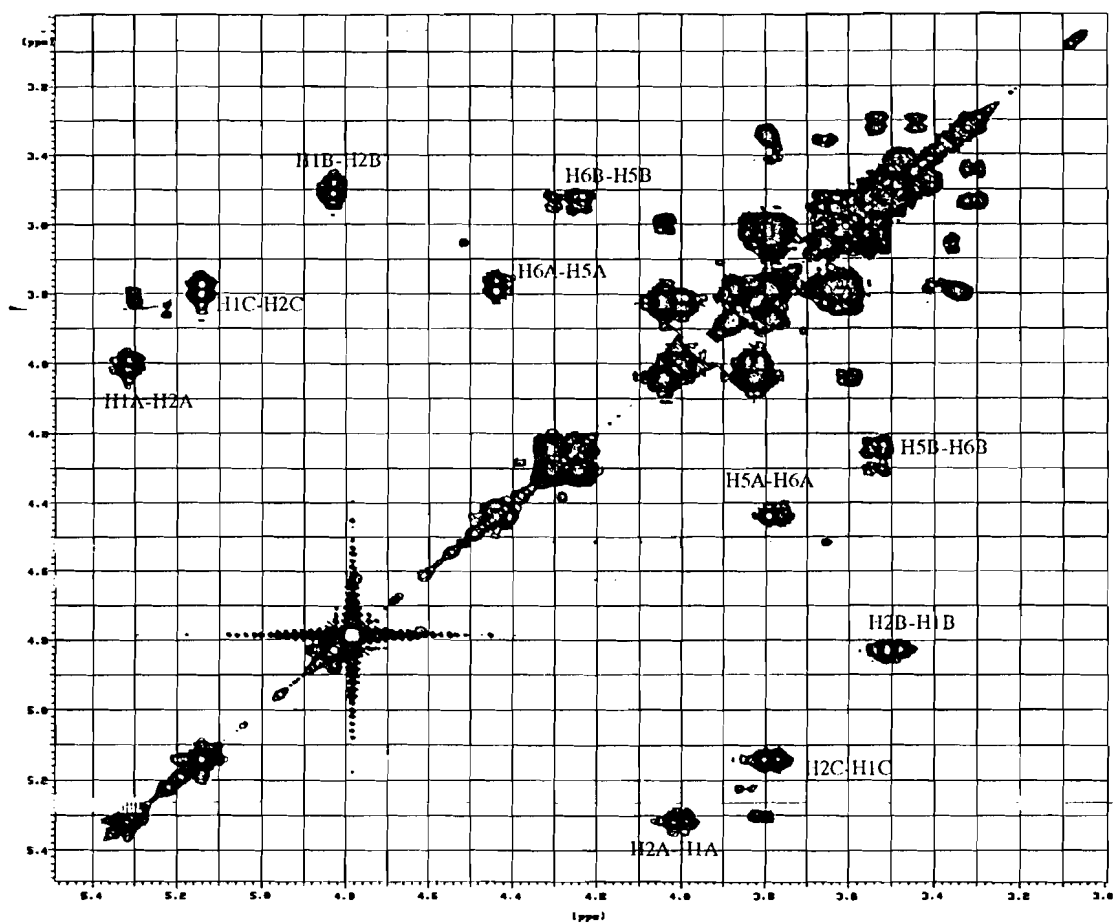


Figure 24. Spectre RMN-COSY ^1H - ^1H du composé **1** des fleurs de *I. asarifolia*.

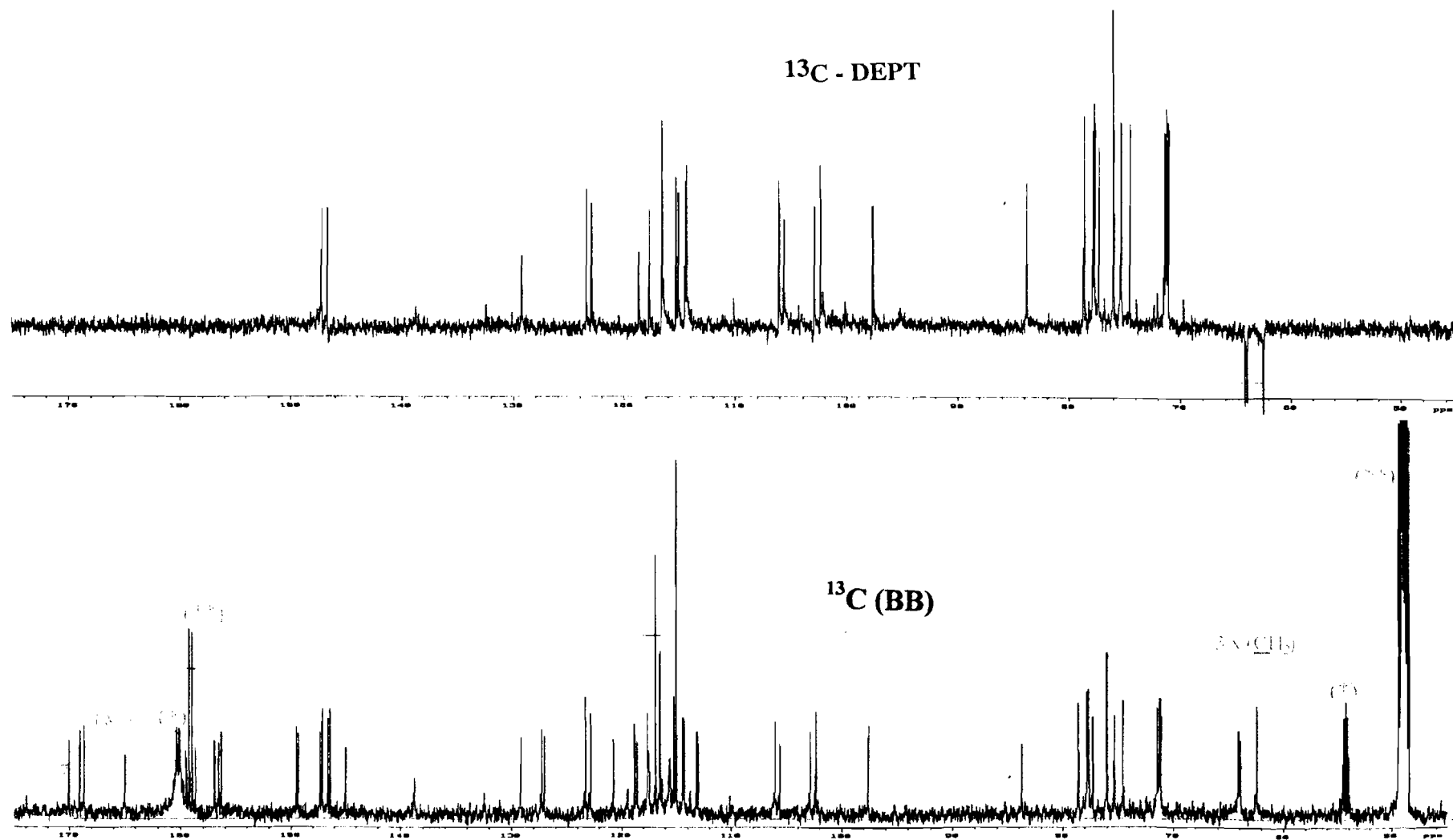


Figure 25. Spectres RMN- ^{13}C [BB (bas) et DEPT (haut)] du composé **1** des fleurs de *I. asarifolia*.

5.2.2 – Étude du composé 3

Le spectre électronique du composé 3 montre en plus de la bande d'absorption vers 528 nm, deux bandes d'absorption vers 295 et 319 nm correspondant aux résidus d'acides (Tableau 7, p. 82 et Fig. 26, p. 53). Le rapport $E_{acyl}/E_{vis.}$ indique la présence de deux molécules d'acides phénoliques. De même, le rapport $E_{440}/E_{vis.}$ comparé à celui de la cyanidine suggère que la position 5 de cette dernière est substituée [18, 30, 50]. Le déplacement bathochrome du maximum d'absorption dans le visible, obtenu par addition de chlorure d'aluminium, indique la présence de groupements hydroxyles vicinaux sur l'anthocyanidine. Après hydrolyse acide, 3 a libéré le glucose qui a été identifié par CPG sous forme de TMSSi. Les CCM analytiques des produits obtenus après hydrolyse alcaline ont abouti à l'identification des acides caféique et *p*-coumarique. Ces résultats indiquent que ces dernières molécules d'acides phénoliques estérifient des substituants glucosyles et sont en bout de chaîne [29, 51]. Les spectres de masse (ESI-MS) (Fig. 27, p. 54) montrent un ion moléculaire à m/z 1081 (100%) correspondant à la formule moléculaire $C_{51}H_{53}O_{26}$ et les pics des fragments à m/z 935 (4%) [M-coumaryle]⁺, 919 (40%) [M-caféyle]⁺, 773 (2%) [M-(coumaryle-caféyle) ou -(coumaryle-glucosyle)]⁺, 611 (4%) [M-coumaryle-caféyle-glucosyle]⁺, 449 [M-coumaryle-caféyle-(glucosyle) x 2]⁺, 287 [M-coumaryle-caféyle-(glucosyle) x 3]⁺ (Tableau 7, p. 82). La spectrométrie RMN incluant les expériences "TOCSY-1D (Fig. 29, p. 56), DIFFNOE (Fig. 30, p. 57), DQF-COSY (Fig. 31, p. 58), HMBC" et les mesures RMN ¹³C (Fig. 32, p. 59) furent nécessaires pour une identification complète de la structure (Tableau 8, p. 83). Sur les spectre RMN ¹H (Fig. 28, p. 55), les signaux des protons du noyau cyanidine ont été clairement détectés à δ (ppm) 8,85 (H-4), 8,22 (H-6'), 7,92 (H-2'), 7,00 (H-5'), 6,86 (H-6) et 6,84 (H-8). Deux paires de doublets apparaissent à δ (ppm) (5,96 ; 7,20) et (5,81 ; 7,10) avec un large couplage ($J \sim 16$ Hz), confirmant ainsi la configuration *E* des

protons oléfiniques des molécules d'acides phénoliques. Presque tous les protons des sucres apparaissent entre δ 3,0 et 5,5 ppm dans un massif. Toutefois, les trois doublets caractéristiques correspondant aux protons H-1 des glucoses A, B et C sont clairement observés, respectivement, à δ 5,32, 4,79 et 5,12 ppm. Leur configuration β est confirmée par la forte valeur de leur constante de couplage ($J \sim 7-8$ Hz). Les spectres RMN ^1H et ^{13}C incluant les expériences "TOCSY 1D, DIFFNOE et HMBC (Tableau 8, p. 83 et Fig. 28 à 32, p. 55 à 59) permis de confirmer que les données et caractéristiques structurales de 3 sont identiques à celles de 1 à l'exception l'acide caféique (acyle II) qui est remplacé par l'acide coumarique. Cette modification a été confirmée par les spectres RMN ^{13}C sur lesquels apparaissent clairement des signaux à δ 130.9 et 116.8 avec des intensités doubles correspondant, respectivement, au (C-2, C-6) et (C-3, C-5) de l'acide coumarique. Finalement, le pigment 3 a été identifié comme étant la cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-coumaryl)- β -*D*-glucopyranosyl)-(6-*O*-*E*-caféyl)- β -*D*-glucopyranosyl)-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (Fig. 26a).

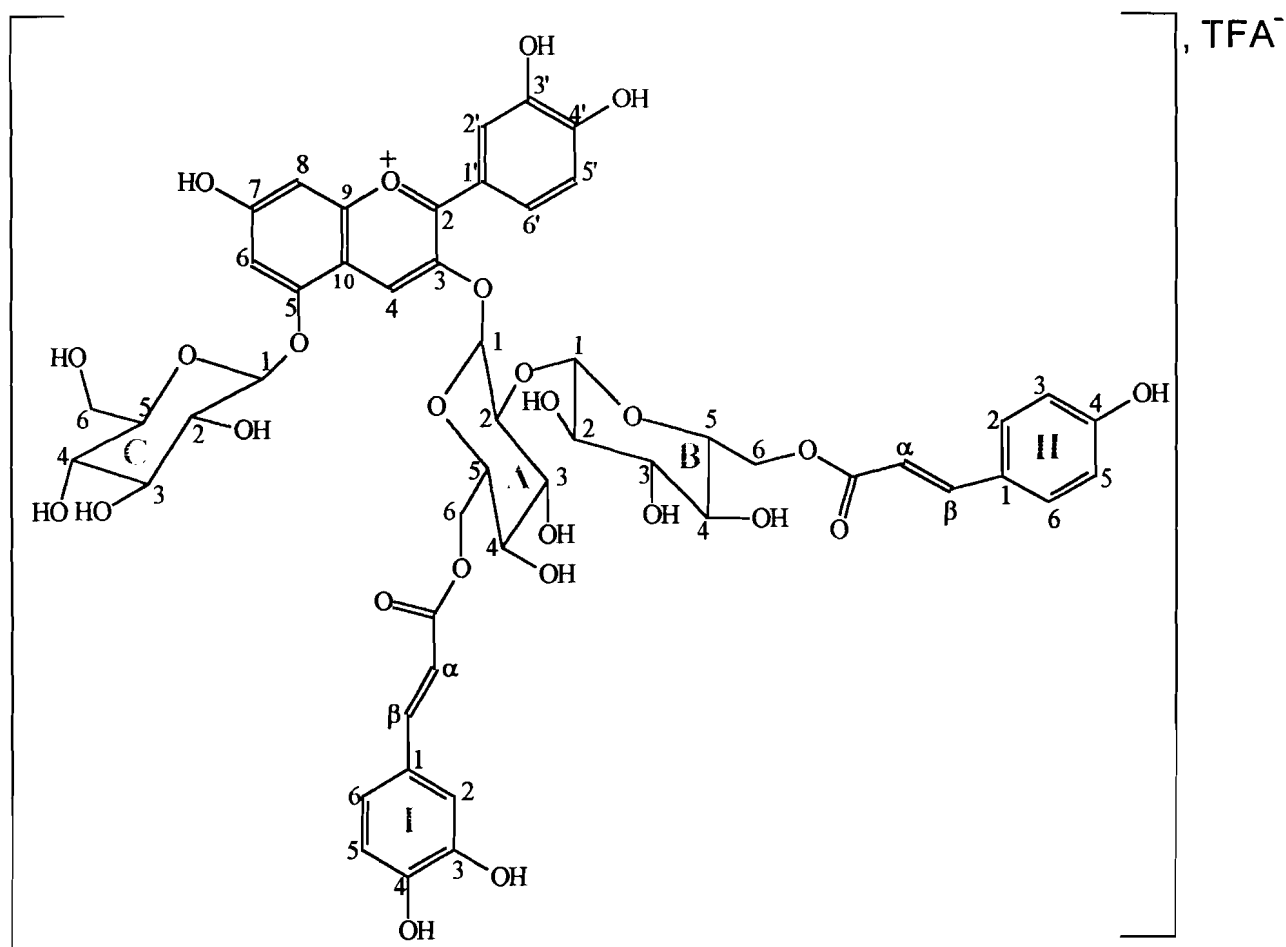


Figure 26a. Structure complète du composé **3** isolé des fleurs de *I. asarifolia*.

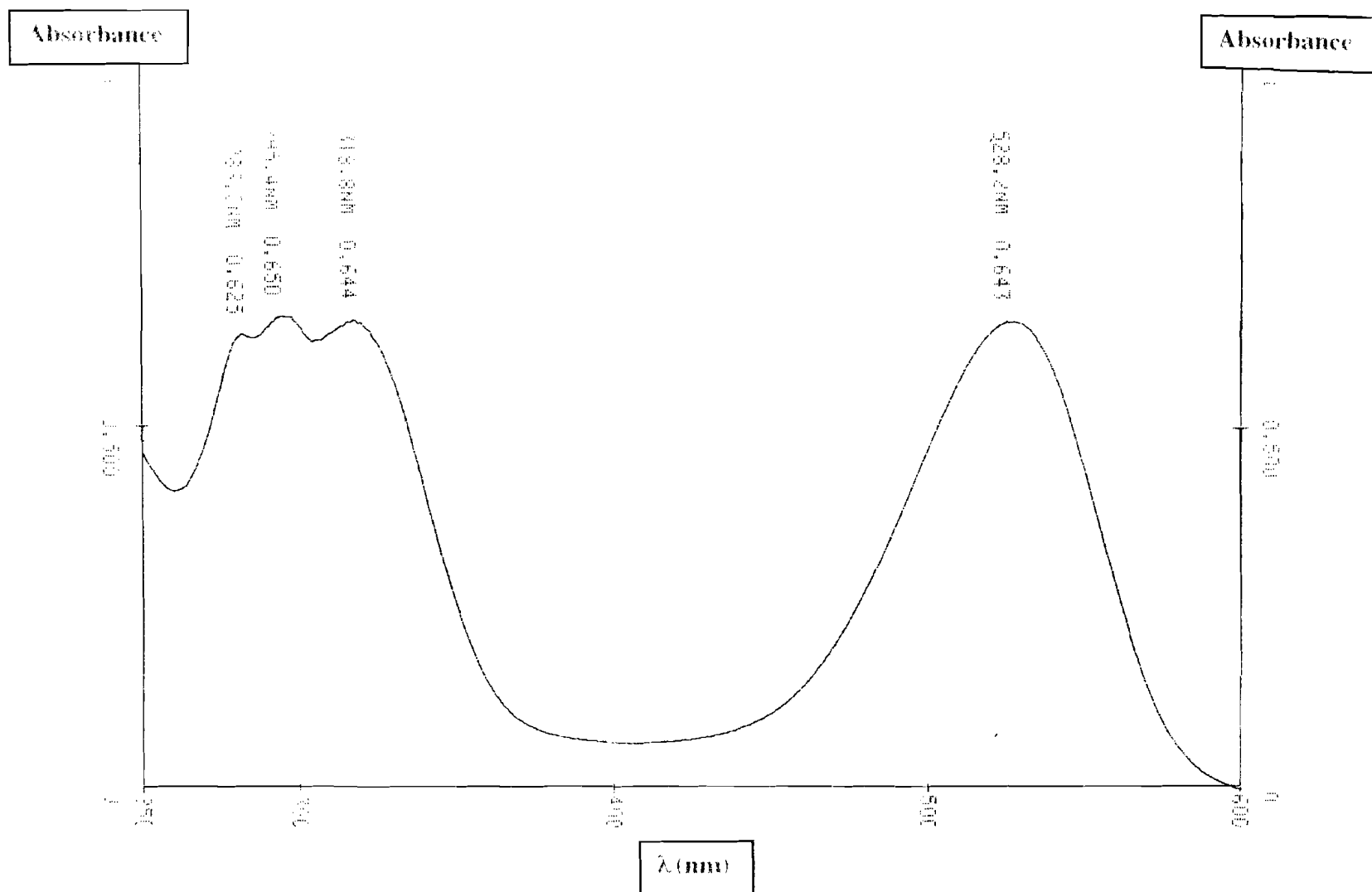


Figure 26. Spectre électronique du composé **3** des fleurs de *I. asarifolia*

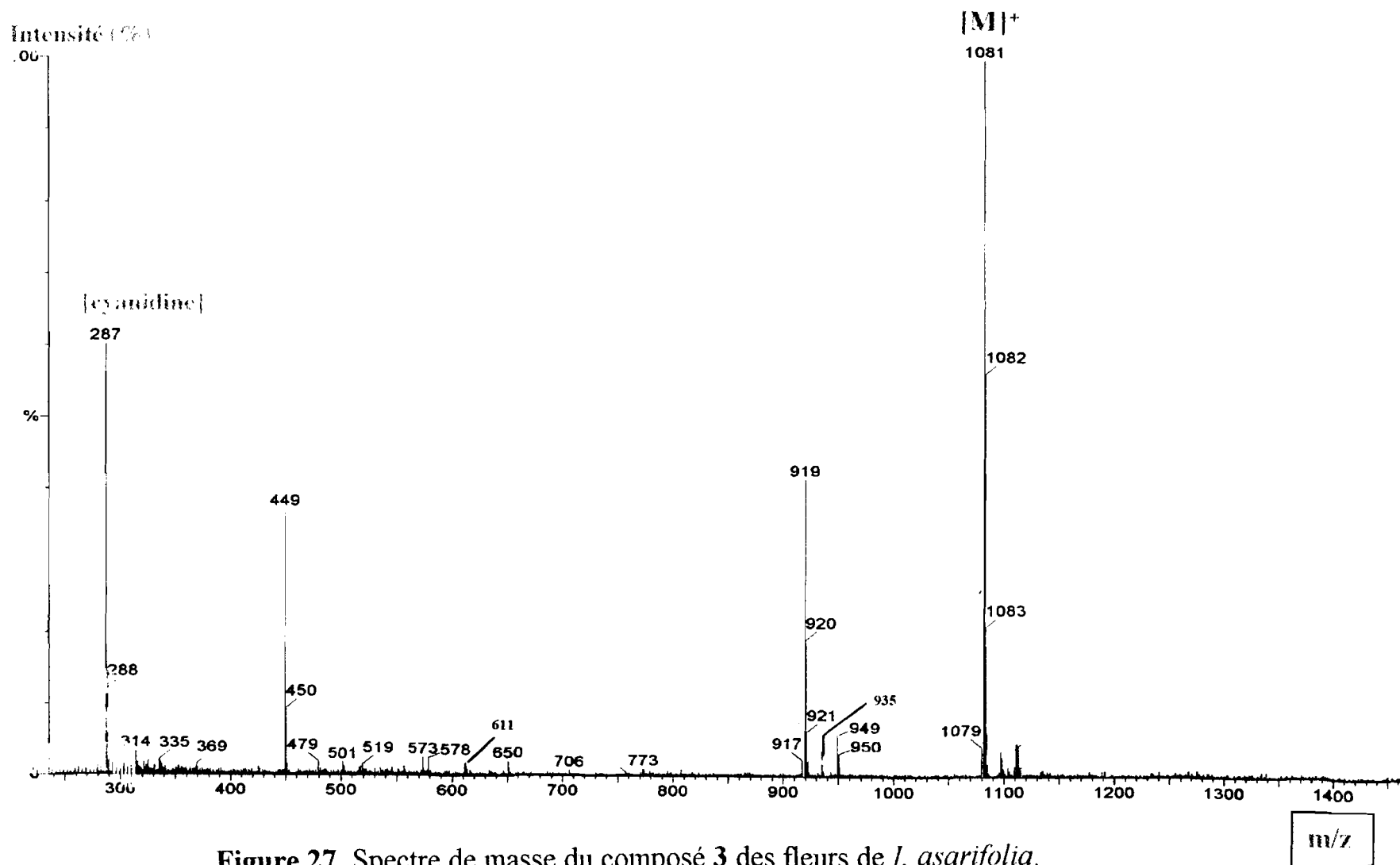


Figure 27. Spectre de masse du composé **3** des fleurs de *I. asarifolia*.

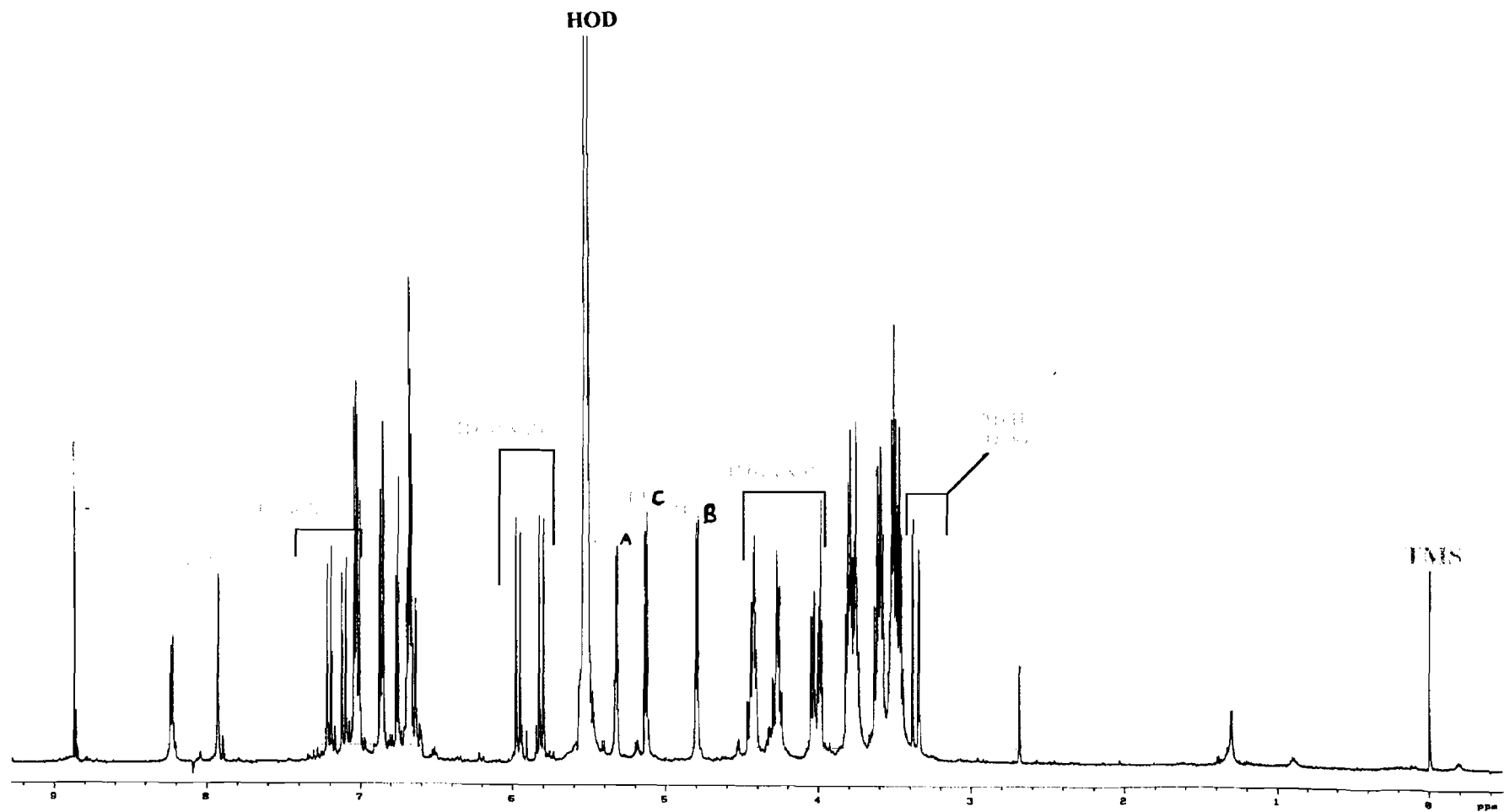


Figure 28. Spectre RMN-1H du composé 3 des fleurs de *I. asarifolia*.

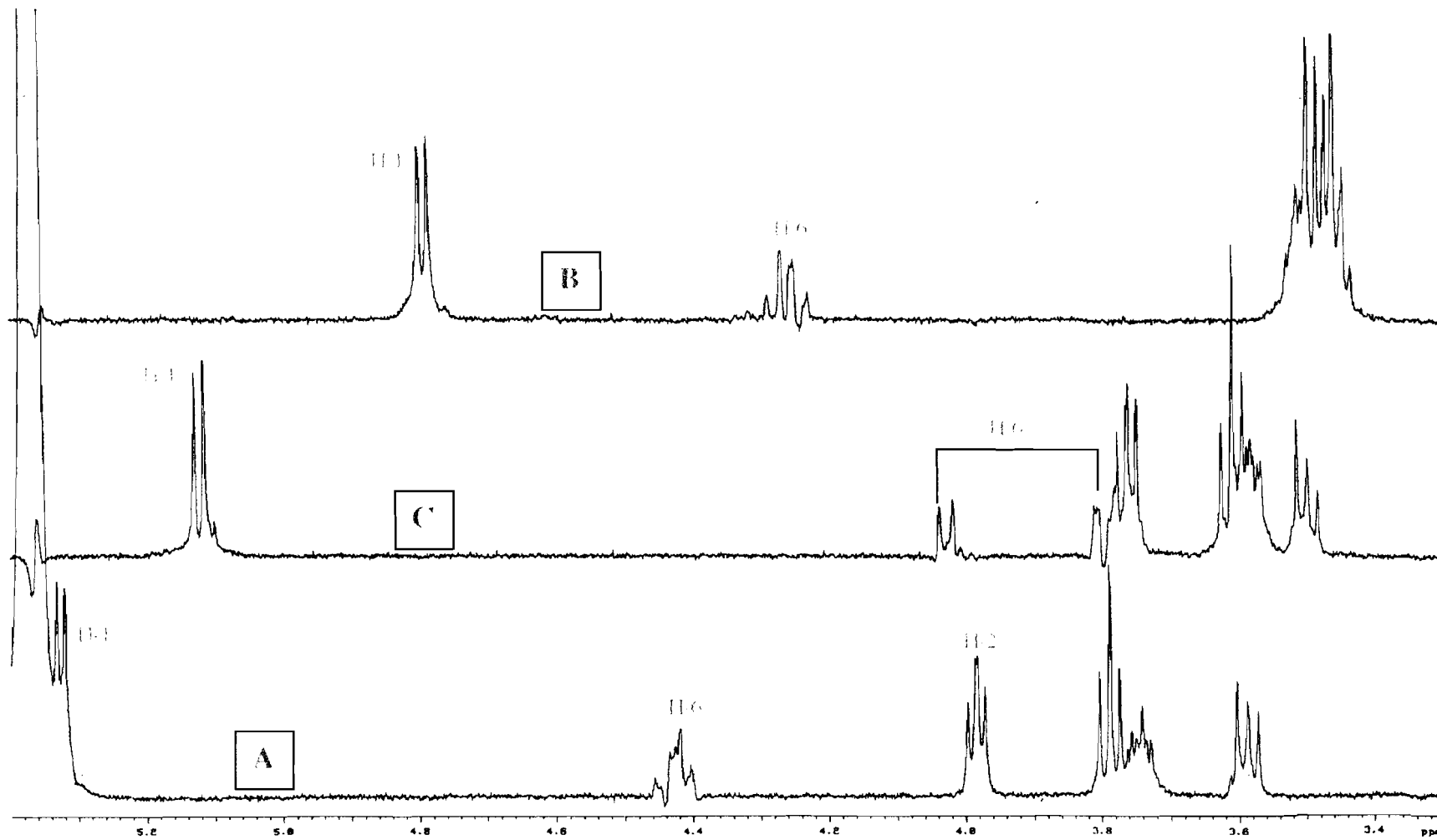


Figure 29. Spectres RMN-TOCSY 1D du composé **3** des fleurs de *I. asarifolia*. Irradiation selective des signaux des protons anomériques (H-1A, H-1B, H-1C) des glucosyles

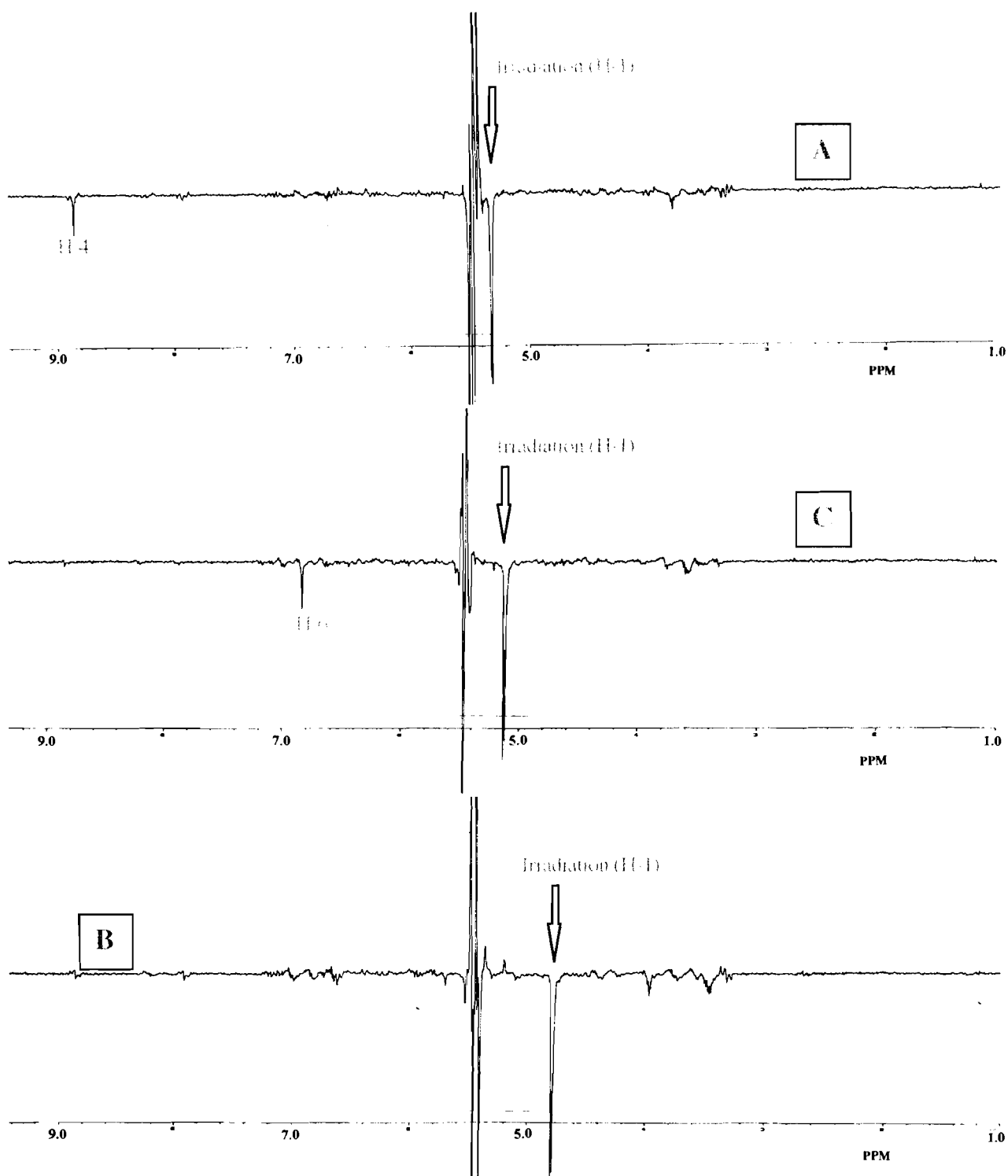


Figure 30. Spectres RMN des effets overhauser (NOEDIFF) du composé **3** des fleurs de *I. asarifolia*. Irradiation selective des signaux des protons anomériques (H-1A, H-1B, H-1C, H-1D) des glucosyles

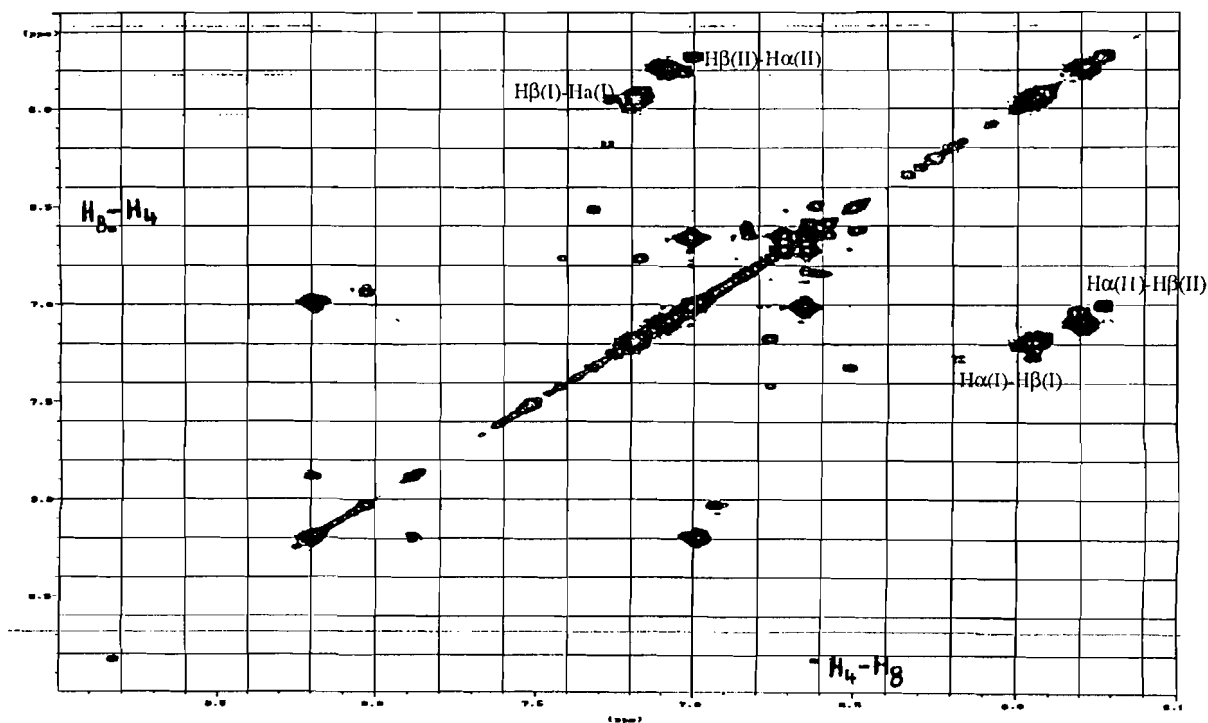
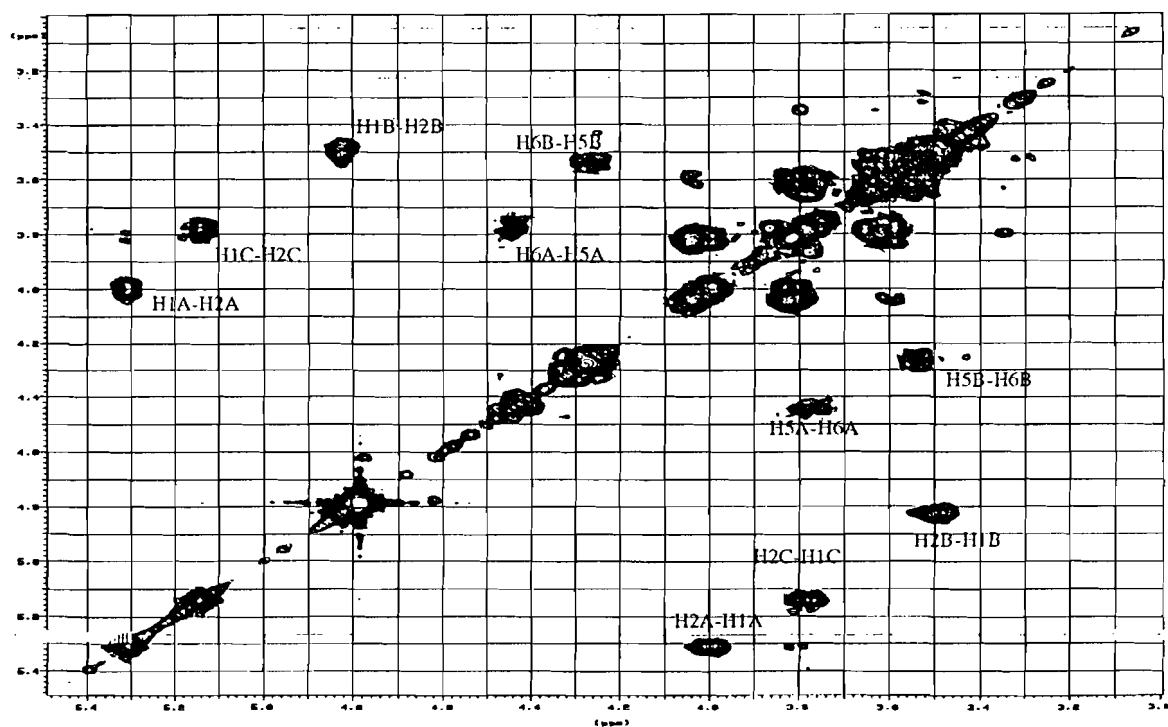


Figure 31. Spectre RMN-COSY 1H-1H du composé **3** des fleurs de *I. asarifolia*.

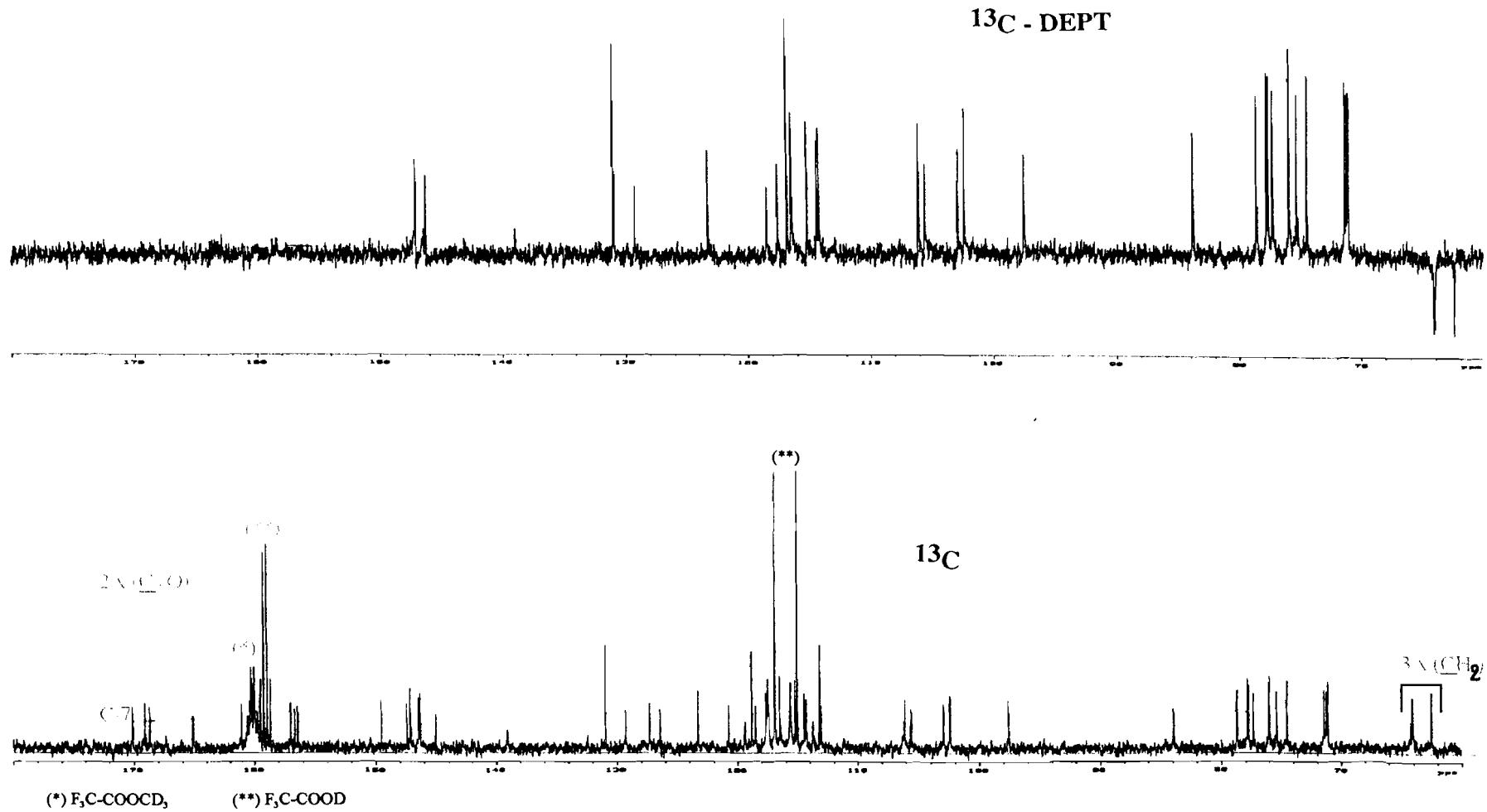


Figure 32. Spectres RMN- ^{13}C [BB (bas) et DEPT (haut)] du composé 3 des fleurs de *I. asarifolia*.

5.2.3 – Étude du composé **5**

En plus de l'absorption vers 531 nm, le spectre électronique du composé **5** montre deux bandes d'absorption vers 293 et 324 nm correspondant aux résidus d'acides phénoliques (Tableau 7, p. 82 et Fig. 34, p. 63). Le rapport $E_{\text{acyle}}/E_{\text{vis}}$ indique la présence de trois molécules d'acides phénoliques. De même, le rapport E_{440}/E_{vis} , comparé à celui de la cyanidine suggère que la position 5 de l'aglycone soit substituée [18, 30, 50]. Le déplacement bathochrome du maximum d'absorption dans le visible, obtenu par addition de chlorure d'aluminium, indique la présence de groupements hydroxyles vicinaux sur l'anthocyanidine. Après hydrolyse acide, **5** a libéré le glucose qui a été identifié par CPG sous forme de TMSSi. Les CCM analytiques des produits obtenus après hydrolyse alcaline ont abouti à l'identification des acides caféique et 3,5-dihydroxycinnamique. Ces résultats indiquent que ces dernières molécules d'acides phénoliques estérifient des substituants glucosyles et sont certainement en bout de chaîne [29, 51]. Le spectre de masse (ESI-MS, Fig. 35, p. 64 et Tableau 7, p. 82) montre un ion moléculaire à m/z 1421 correspondant à la formule moléculaire $C_{66}H_{69}O_{35}$ et des pics des fragments secondaires à 1259 [M-(3,5-dihydroxycinnamyle)]⁺, 1097 [M-caféyle-(3,5-dihydroxycinnamyle) ou glucosyle-(3,5-dihydroxycinnamyle)]⁺, 773 [M-(caféyle) x 2 -(3,5-dihydroxycinnamyle) ou -caféyle-3,5-dihydroxycinnamyle-glucosyle], 449 [M-(caféyle) x 2 -3,5-dihydroxycinnamyle-sophorosyle-glucosyle]⁺, 287 [M-(caféyle) x 2 -3,5-dihydroxycinnamyle-sophorosyle-(glucosyle) x 2]⁺. Sur les spectres RMN ¹H, les signaux des protons de l'aglycone (cyanidine) sont quasi identiques à ceux de **1** (Fig. 21 & 36, p. 45 à 65). Trois paires de doublets à δ (5,85 ; 7,11), (5,63 ; 6,93) et (6,16 ; 7,39) avec des larges constantes de couplages ($J \sim 16$ Hz) sont observés, confirmant la configuration *E* des protons oléfiniques des trois résidus d'acides phénoliques. Quatre protons anomériques à δ 4,80, 4,94, 5,14, 5,36 avec des constantes de couplages ($J \sim 7-8$ Hz) démontrent

que tous les résidus glucosidiques sont présents sous leurs formes β -D-glucopyranosyles. Les expériences "TOCSY 1D" (Fig. 37, p. 66) ont permis d'observer le déplacement vers des champs faibles des signaux de trois groupes de protons méthyléniques (H-6a, H-6b ; Tableau 8, p. 82). Ces sucres sont certainement acylés sur leur hydroxyle méthylénique. Les positions d'attache des sucres ont été obtenues sans ambiguïté par les expériences "NOE" (Fig. 38, p. 67). Par irradiations successives des signaux des protons anomériques des glucosyles A (H-1A), C (H-1C) et D (H-1D), des effets NOE sur H-3 (aglycone), H-6 (aglycone) et H-5 (acyle I) sont respectivement observés. Ceci montre que les glucosyles A, C et D sont liés, respectivement, à l'aglycone (cyanidine sur les hydroxyles 3 et 5) et à l'acyle I (sur l'hydroxyle en position 5) par des liaisons glucosidiques. L'irradiation du signal du proton anomérique du glucosyle B (H-1B) n'a donné aucun effet NOE. Les techniques HMBC montrent une corrélation entre C-1B et H-2A (Fig. 41, p. 70), confirmant ainsi une liaison interglucosidique 1->2 entre les glucoses B et A. En outre, le déplacement vers des champs plus faibles du signal du proton H-2A ($\Delta\delta_{H2A-B} = 0,5$) a été observé. Les techniques DEPT et HMBC (Fig. 40 & 41) ont permis l'attribution efficace des signaux à δ 122,8 (H-4) et 159,3 (H-2 et H-6) respectivement, aux carbones C-2, C-4 et C-6 de l'acyle III. Ces signaux n'ont pas été observés pour les pigments 1 et 3. Aussi, les positions de liaison des trois groupements acyles ont été déterminées à l'aide des techniques HMBC. Le pigment 5 a donc été identifié comme étant la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-E-p-caféyl- β -D-glucopyranosyl)]-{6-O-[4-O-(6-O-E-3,5-dihydroxycinnamyl)- β -D-glucopyranosyl]-E-caféyl]- β -D-glucopyranosyl}-5-O- β -D-glucopyranoside. (Fig. 33)

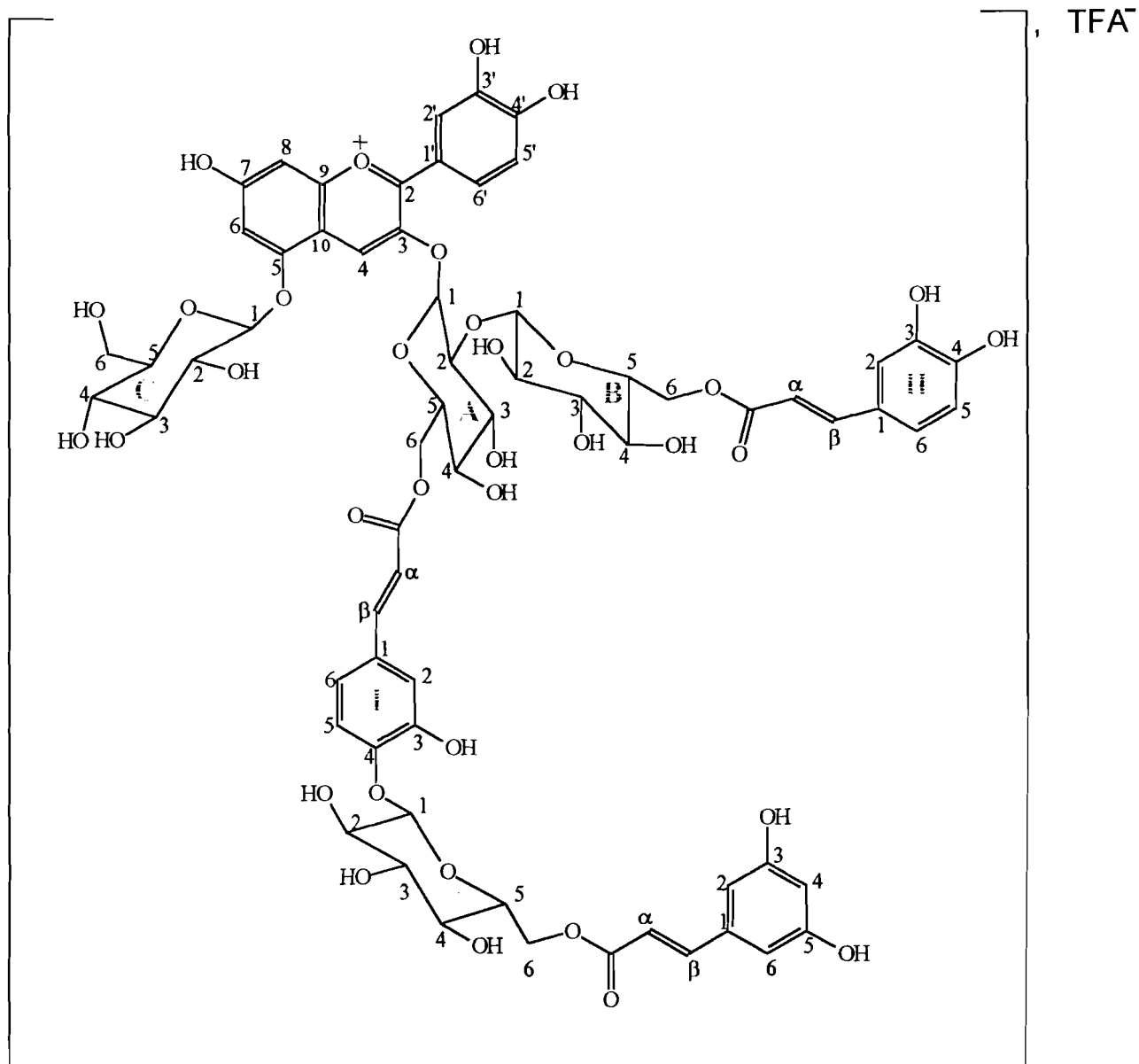


Figure 33. Structure complète du composé 5 isolé des fleurs de *I. asarifolia*.

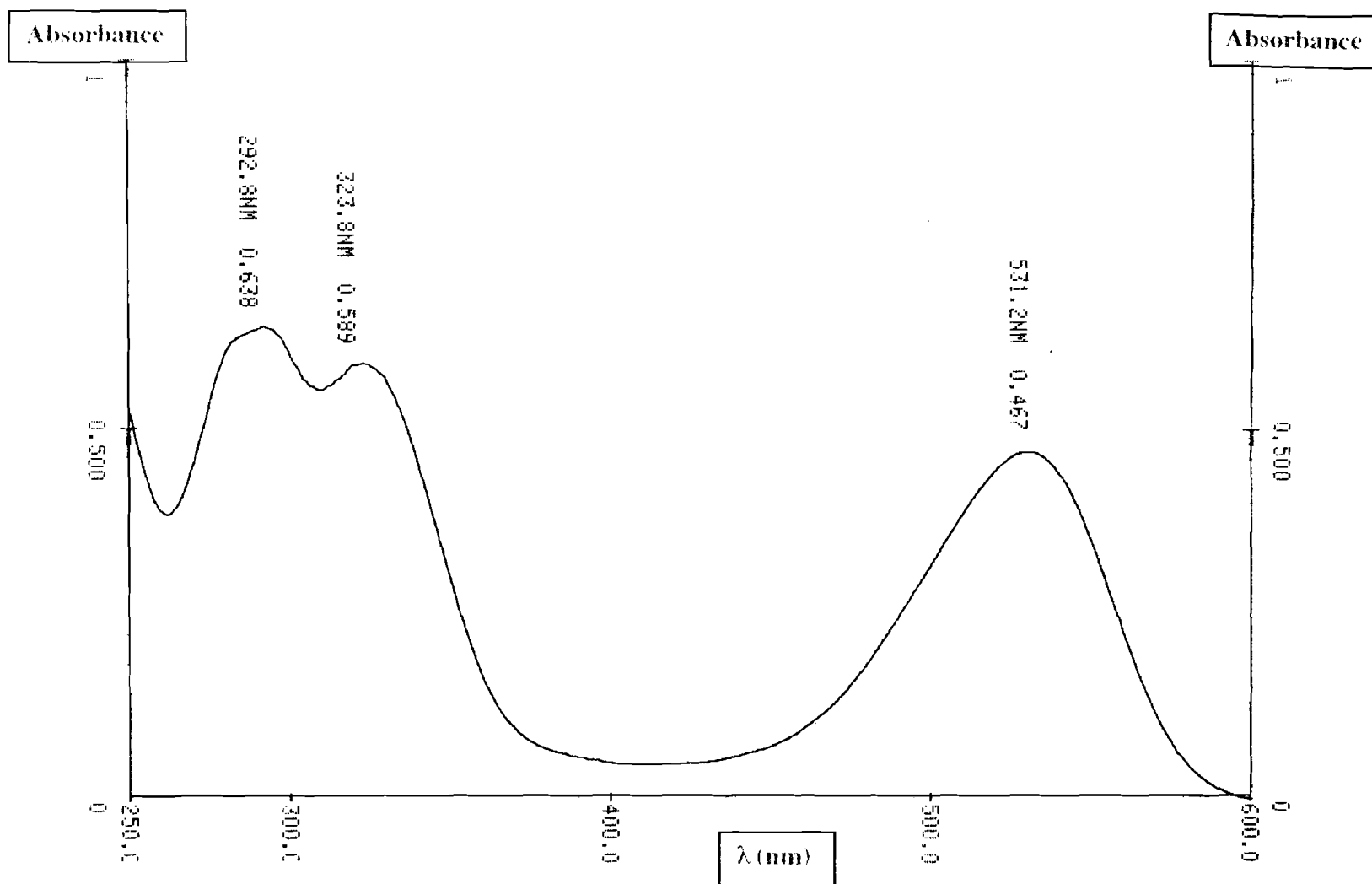


Figure 34. Spectre électronique du composé **5** des fleurs de *I. asarifolia*.

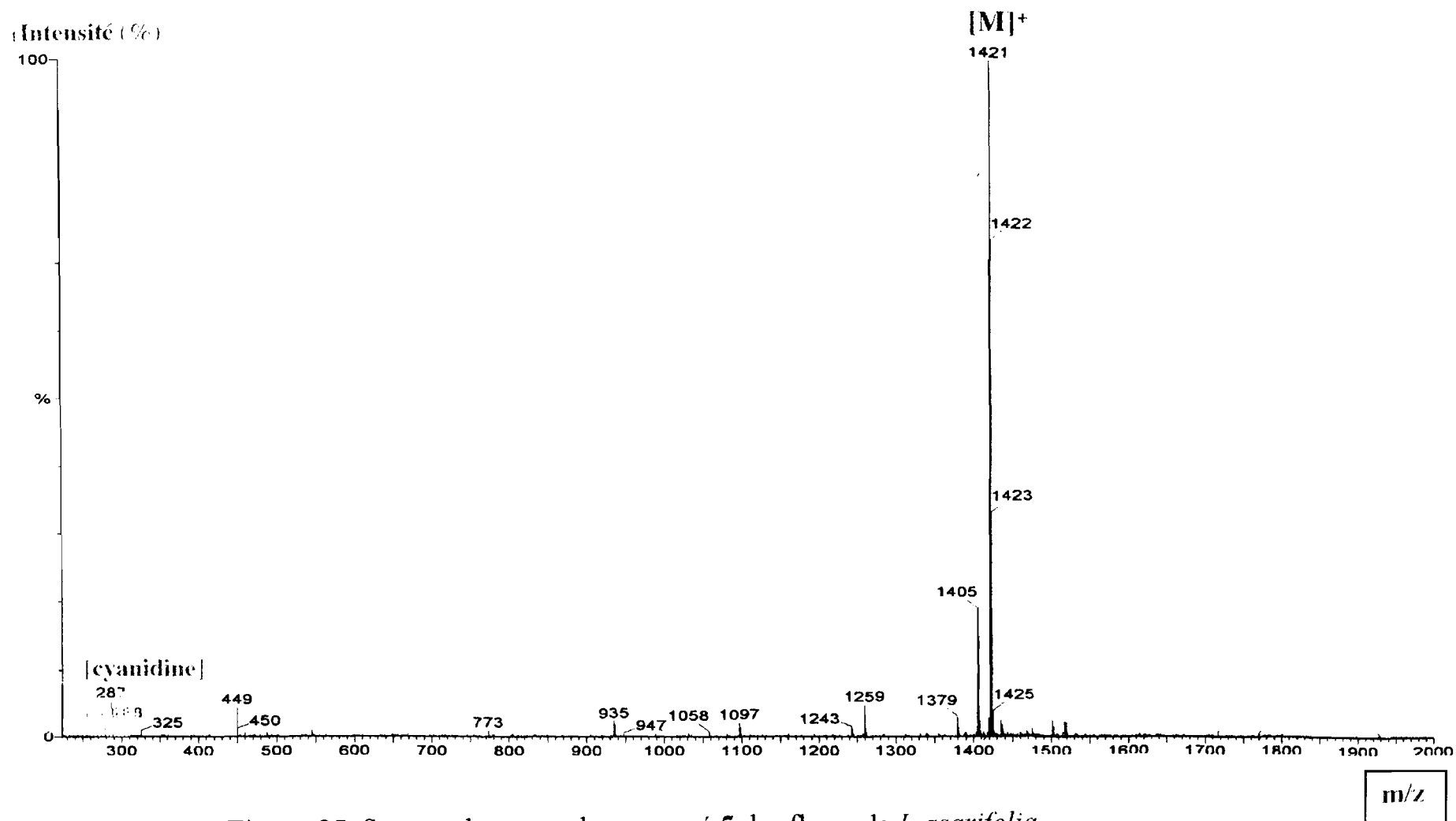


Figure 35. Spectre de masse du composé 5 des fleurs de *I. asarifolia*.

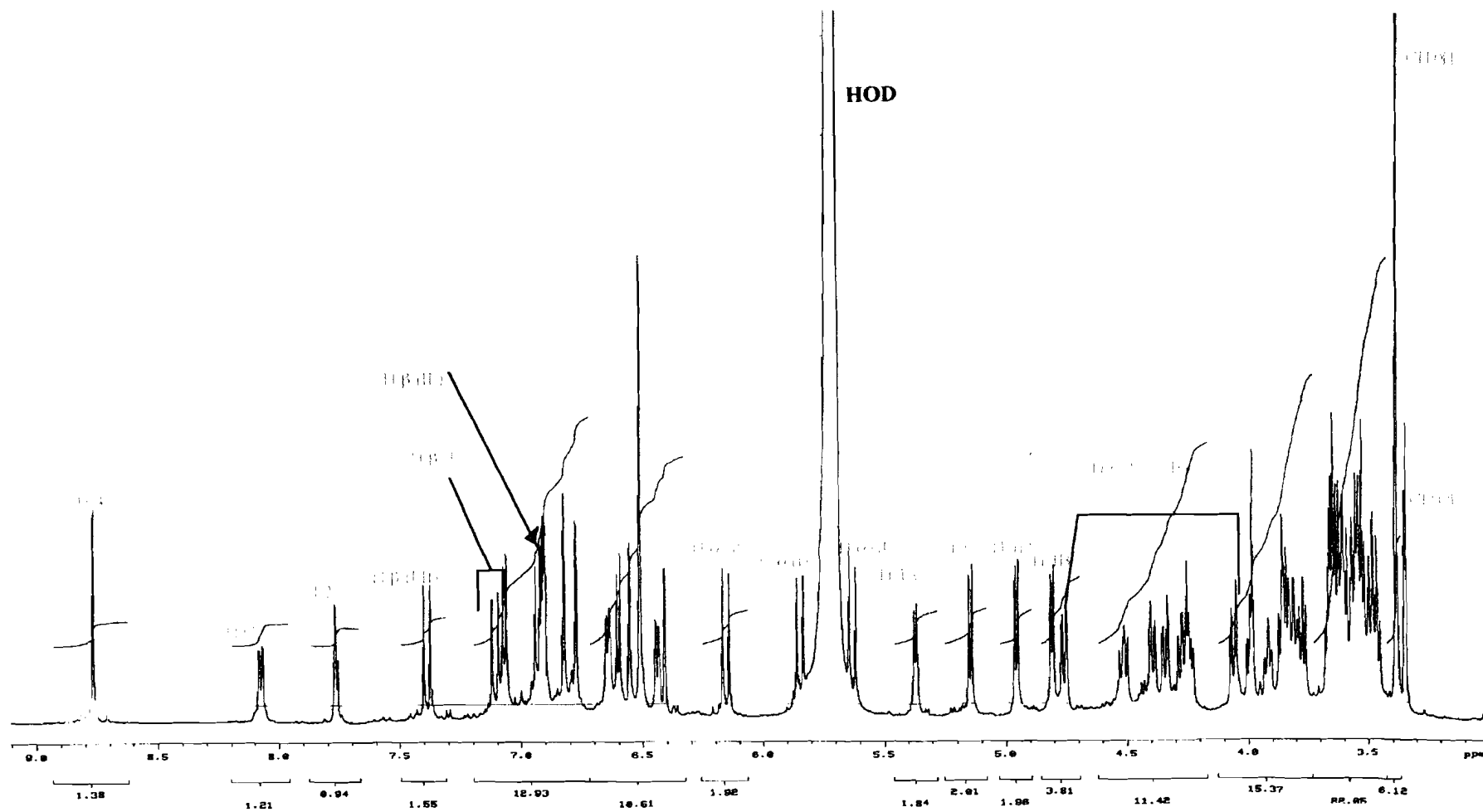


Figure 36. Spectre RMN-1H du composé **5** des fleurs de *I. asarifolia*.

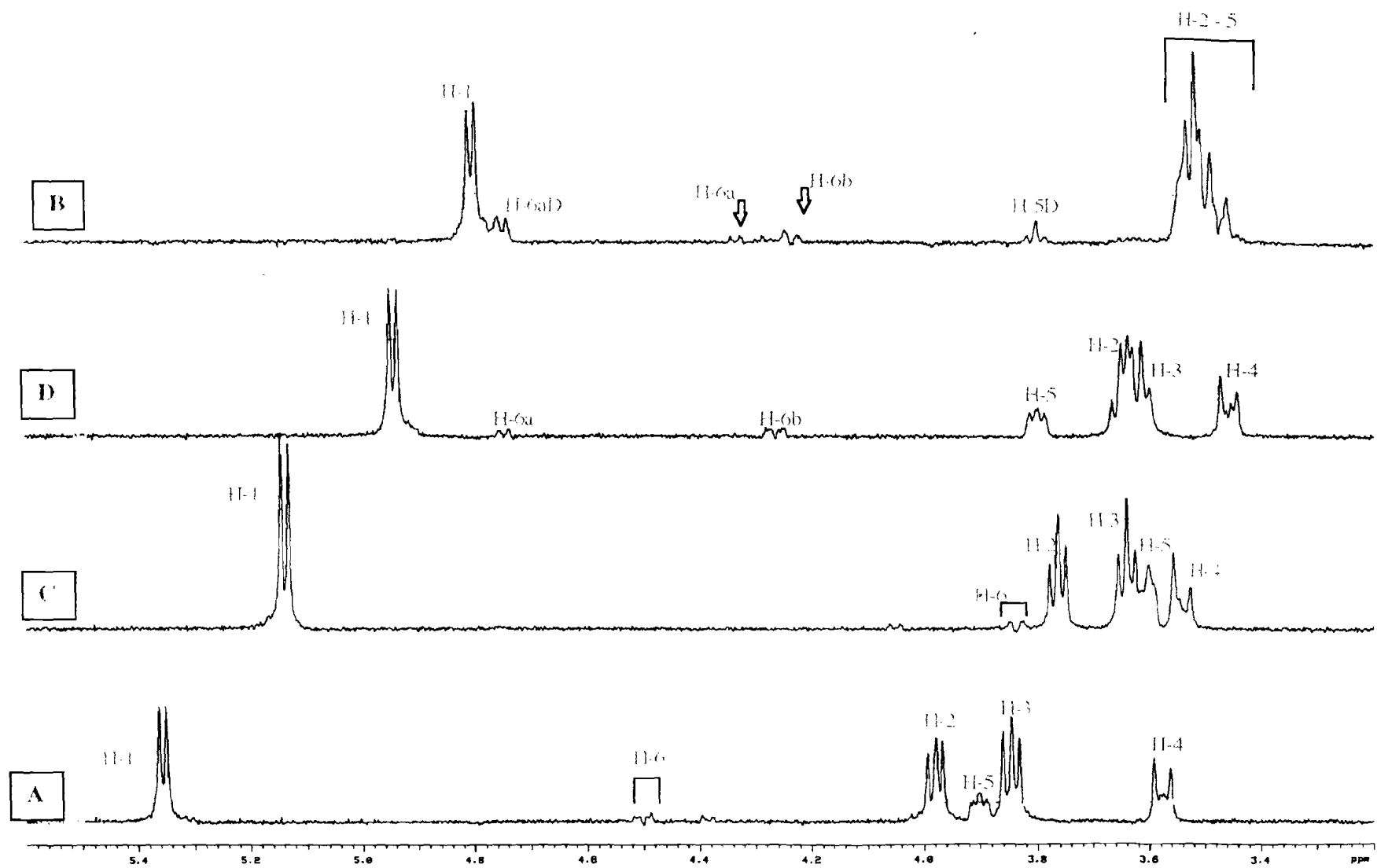


Figure 37. Spectres RMN-TOCSY 1D du composé **5** des fleurs de *I. asarifolia*. Irradiation selective des signaux des protons anomériques (H-1A, H-1B, H-1C, H-1D) des glucosyles

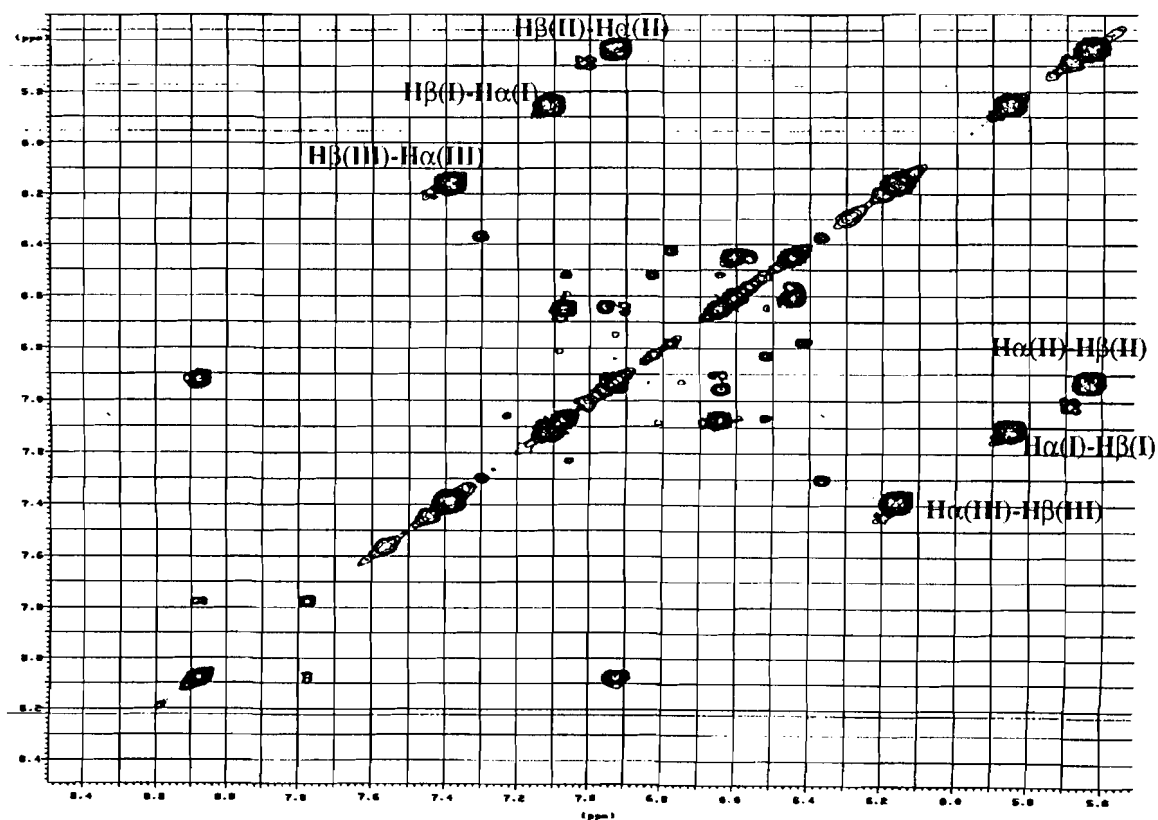
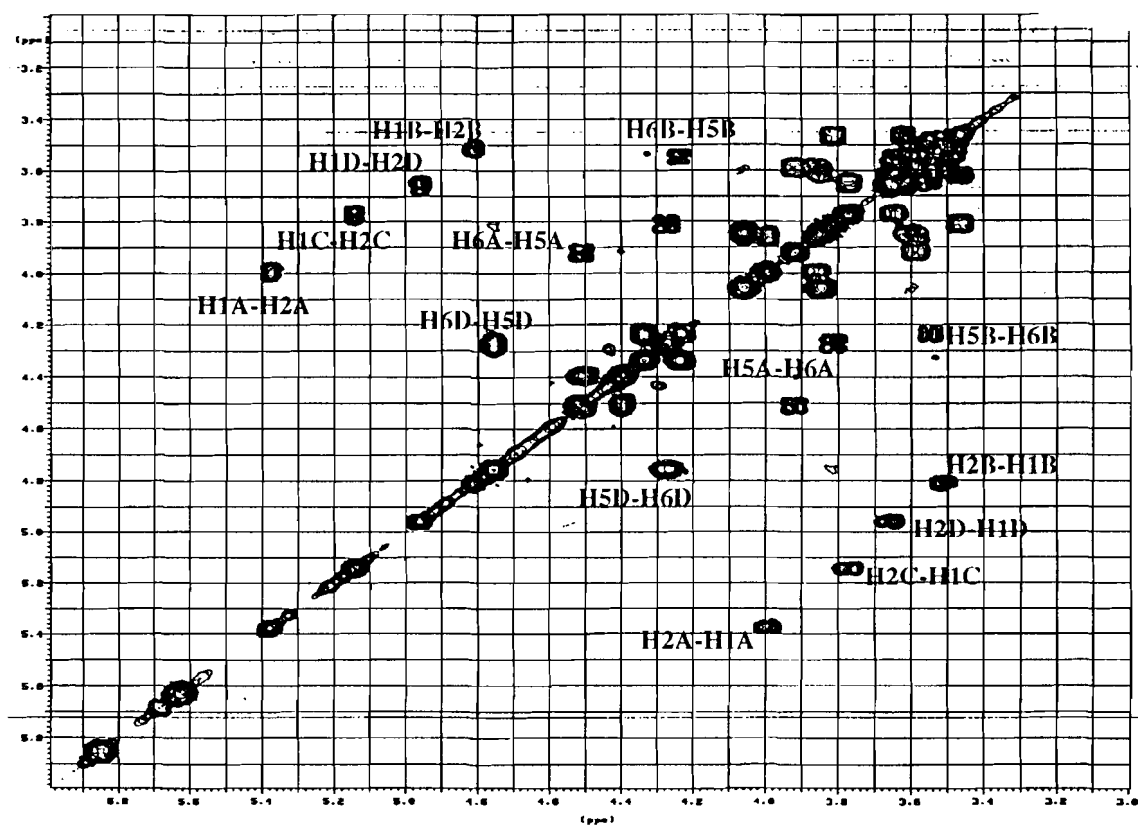


Figure 39. Spectre RMN-COSY 1H-1H du composé 5 des fleurs de *I. asarifolia*.

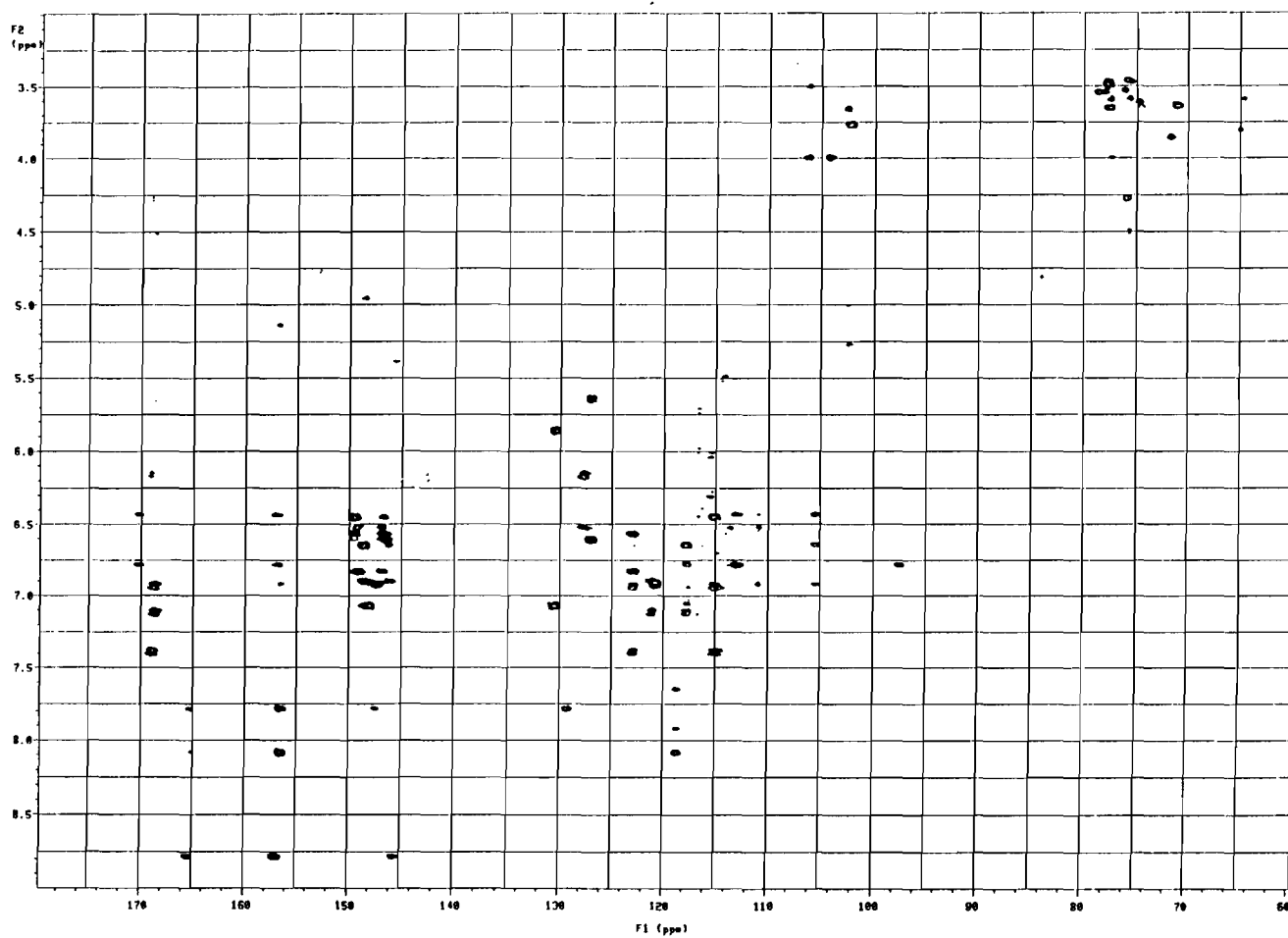


Figure 41. Spectres RMN-HMBC du composé 5 des fleurs de *I. asarifolia*.

5.2.4 – Étude du composé 8

Le spectre électronique de 8 présente 3 maxima : une bande d'absorption due à l'aglycone vers 532 nm et deux autres vers 295 et 312 nm correspondant aux résidus d'acides (Tableau 7, p. 82 et Fig. 43, p. 73). Le rapport $E_{acyle}/E_{vis.}$ indique la présence de trois molécules d'acides phénoliques. De même, le rapport $E_{440}/E_{vis.}$ comparé à celui de la cyanidine suggère que la position 5 de cette dernière soit substituée [18, 30, 50]. Le déplacement bathochrome du maximum d'absorption dans le visible, obtenu par addition de chlorure d'aluminium, indique la présence de groupements hydroxyles vicinaux sur l'anthocyanidine. Le spectre de masse (ESI-MS) montre un ion moléculaire à m/z 1389 (100%) correspondant à la formule moléculaire $C_{66}H_{69}O_{33}$ et les pics des fragments à m/z 1227 [M-glucosyle]⁺, 449 [M- x 2 coumaryle-caféyle-(glucosyle) x 2]⁺, 287 [M- 2 x coumaryle-caféyle -(glucosyle) x 3]⁺ (Fig. 44, p. 74 et Tableau 7, p. 82). La spectrométrie RMN incluant les expériences "TOCSY-1D, DIFFNOE, DQF-COSY (Fig. 46 à 48, p. 76 à 78) ont permis une attribution complète des signaux des protons (Tableau 8, p. 83). Sur les spectres RMN ¹H (Fig. 45, p. 75), les signaux des protons du noyau cyanidine sont clairement détectés à δ 8,83 (H-4), 8,15 (H-6'), 7,77 (H-2'), 6,94 (H-5'), 6, 82 (H-6) et 6, 41 (H-8). Trois paires de doublets apparaissent à δ (5,94 ; 7,18) et (6,23 ; 7,48), (5,70 ; 7,03) avec un large couplage ($J \sim 16$ Hz), confirmant ainsi la configuration *E* des protons oléfiniques de résidus aromatiques. Presque tous les protons des sucres apparaissent entre δ 3,0 et 5,5 dans un massif. Toutefois, les trois doublets caractéristiques correspondant aux protons H-1 des glucose A, B, C et D sont clairement observés, respectivement, à δ 5,41, 4,81, 5,17 et 4,99. La configuration β des glucosyles est confirmée par la forte valeur de leur constante de couplage ($J \sim 7-8$ Hz). Les spectres RMN "TOCSY 1D, DIFFNOE (Tableau 8 et Fig. 46 & 47, p. 76 & 77) ont permis de confirmer que les données et caractéristiques structurales de 8 sont identiques à celles de 5 à l'exception de

l'acide 3,5-dihydroxycinnamique (acyle III) qui est remplacé par l'acide coumarique. Ainsi, le composé **8** isolé des fleurs de *I. sarifolia* a finalement été identifié comme étant la cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-coumaryl)- β -*D*-glucopyranosyl)]-{6-*O*-[4-*O*-(6-*O*-*E*-coumaryl)- β -*D*-glucopyranosyl]-*E*-caféyle]- β -*D*-glucopyranosyl}-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (Fig. 42)

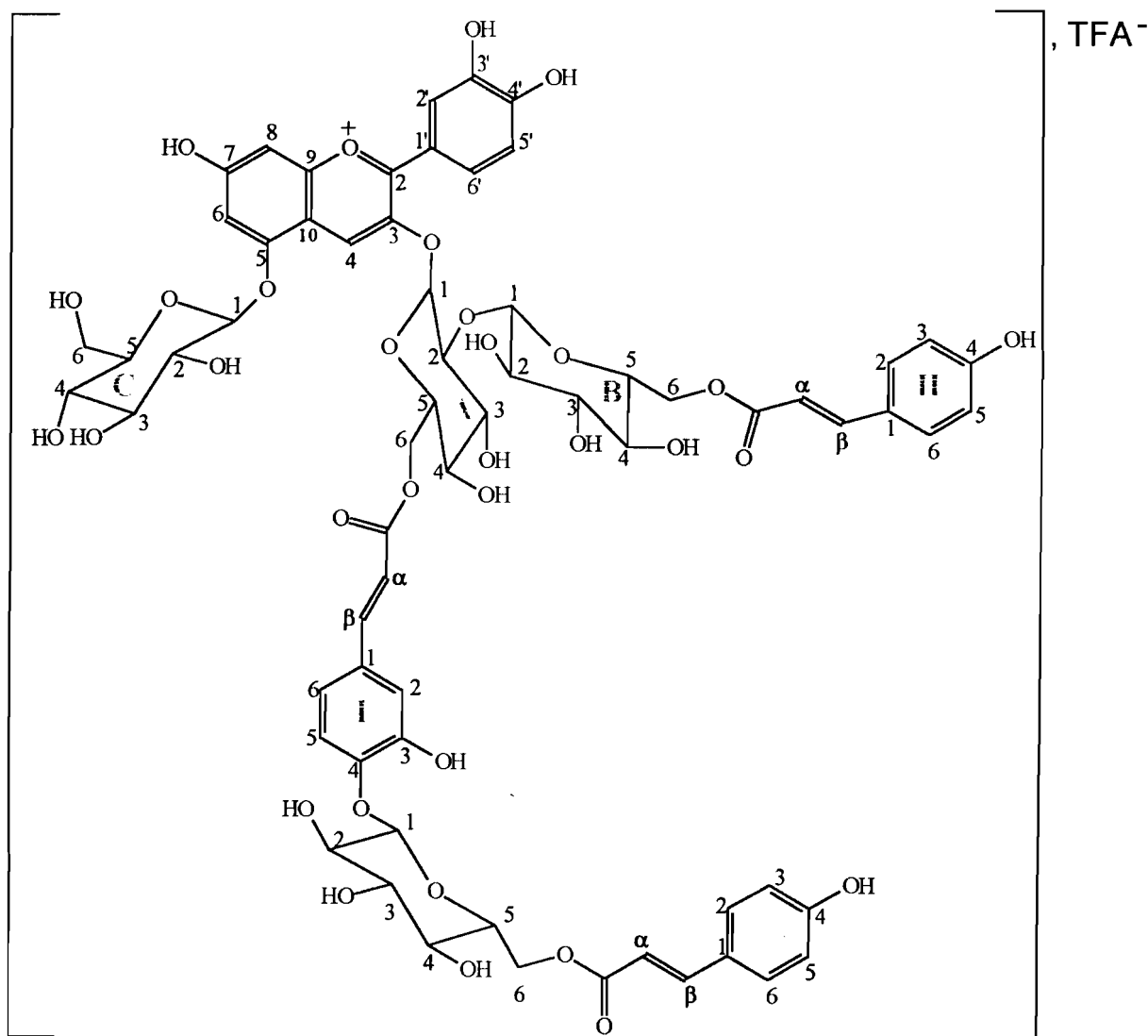


Figure 42. Structure complète du composé **8** isolé des fleurs de *I. asarifolia*.

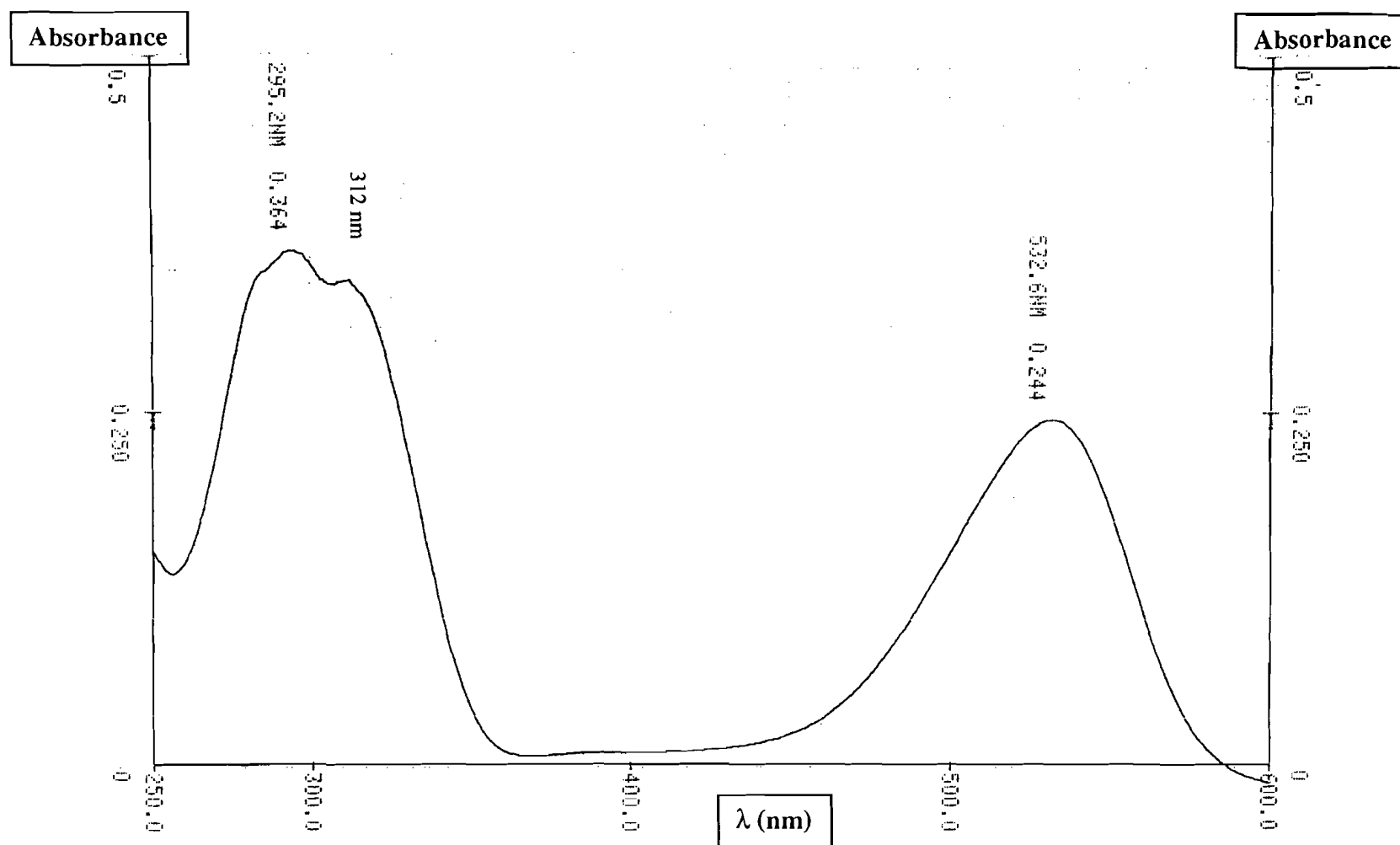


Figure 43. Spectre électronique du composé **8** des fleurs de *I. asarifolia*.

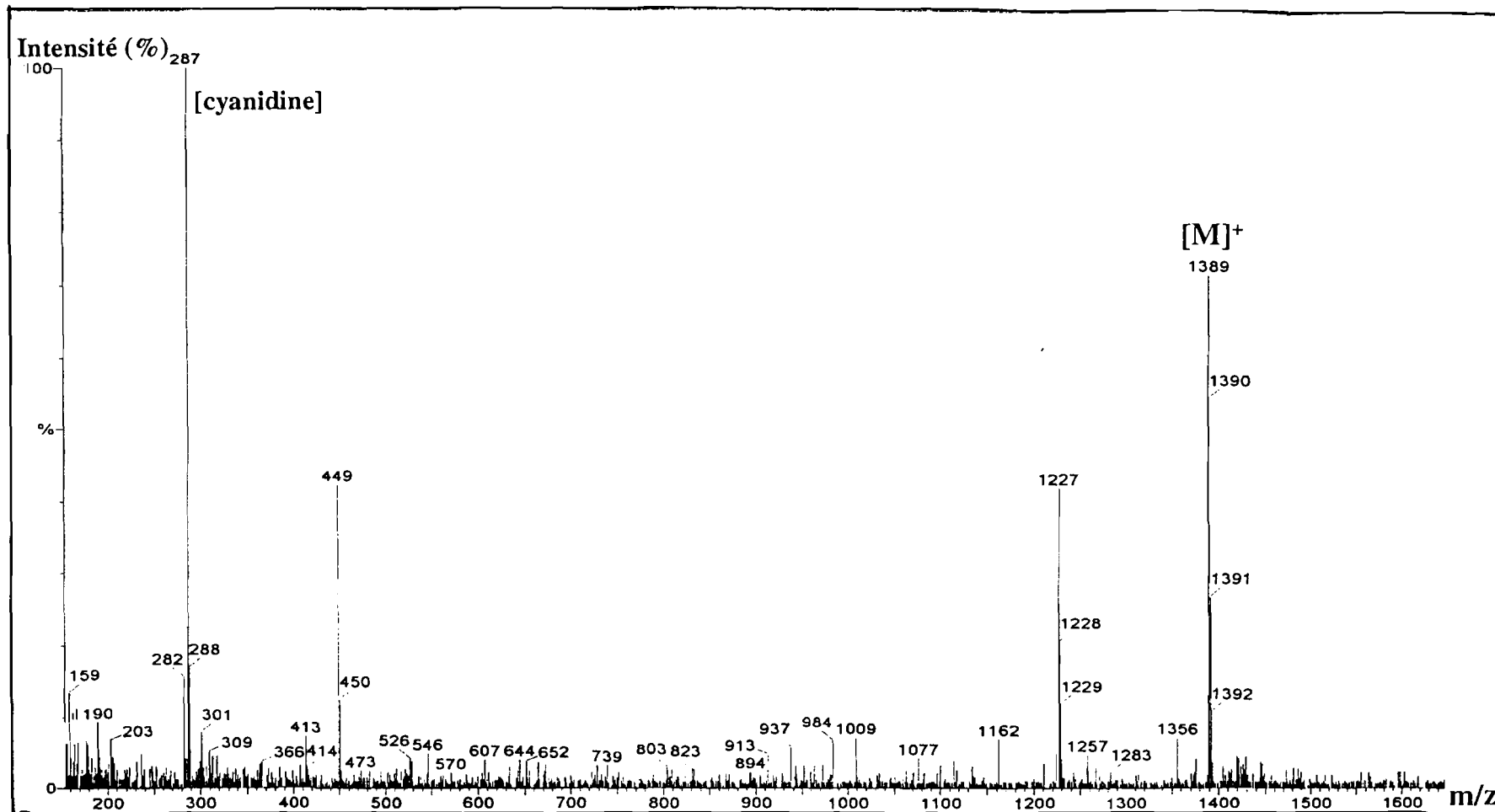


Figure 44. Spectre de masse du composé **8** des fleurs de *I. asarifolia*.

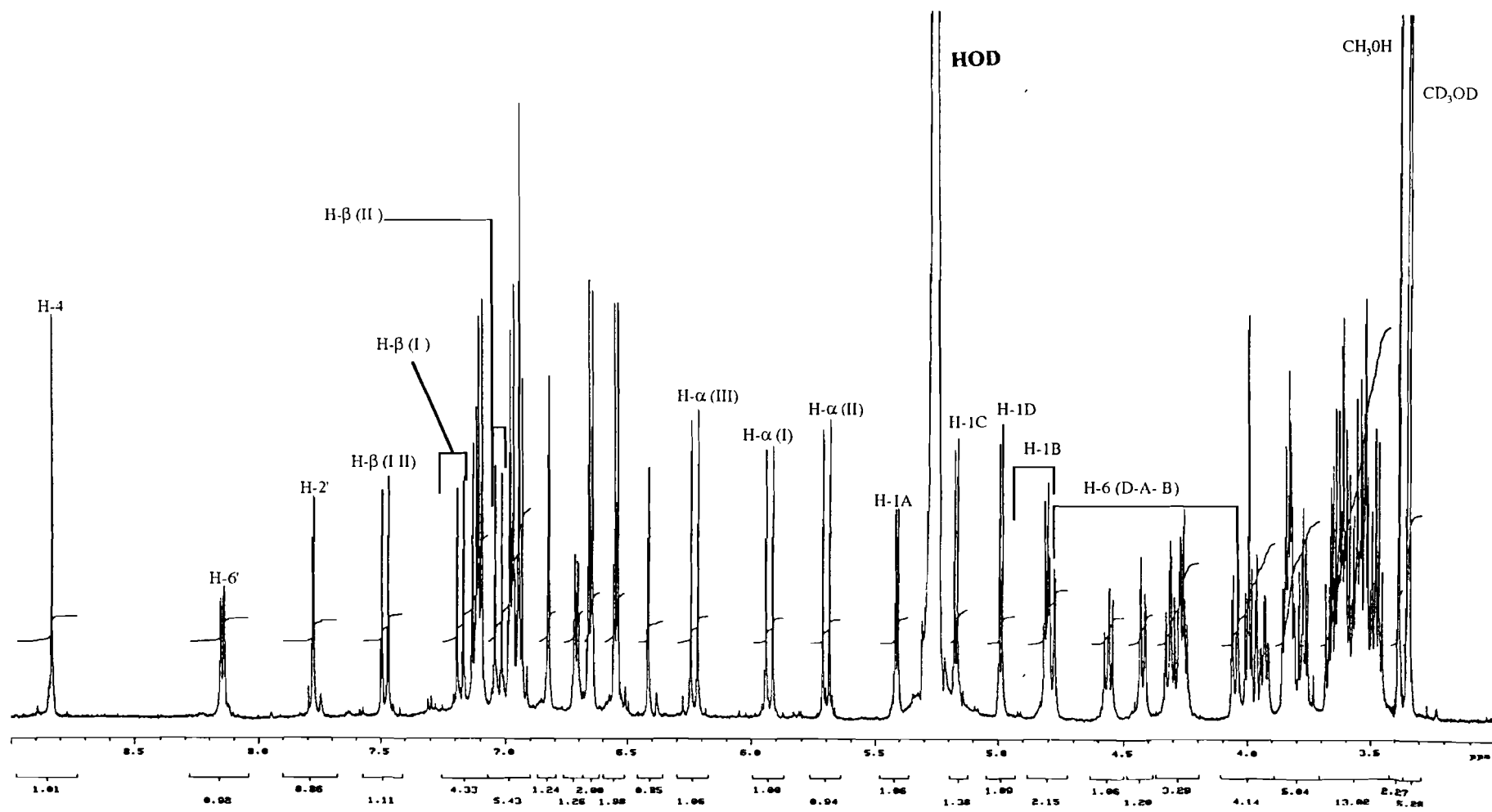


Figure 45. Spectre RMN-1H du composé **8** des fleurs de *I. asarifolia*.

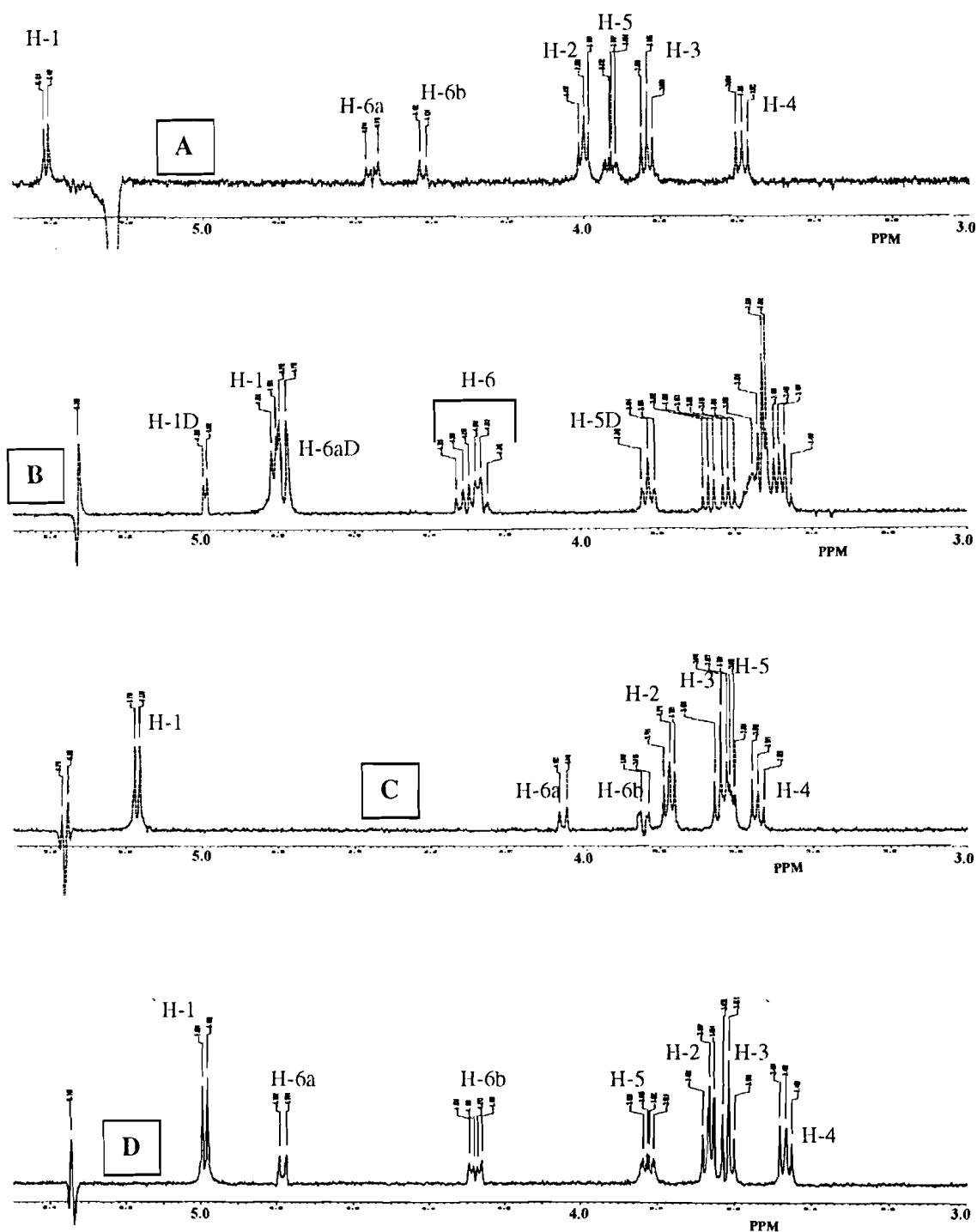


Figure 46. Spectres RMN-TOCSY 1D du composé **8** des fleurs de *I. asarifolia*. Irradiation selective des signaux des protons anomériques (H-1A, H-1B, H-1C, H-1D) des glucosyles

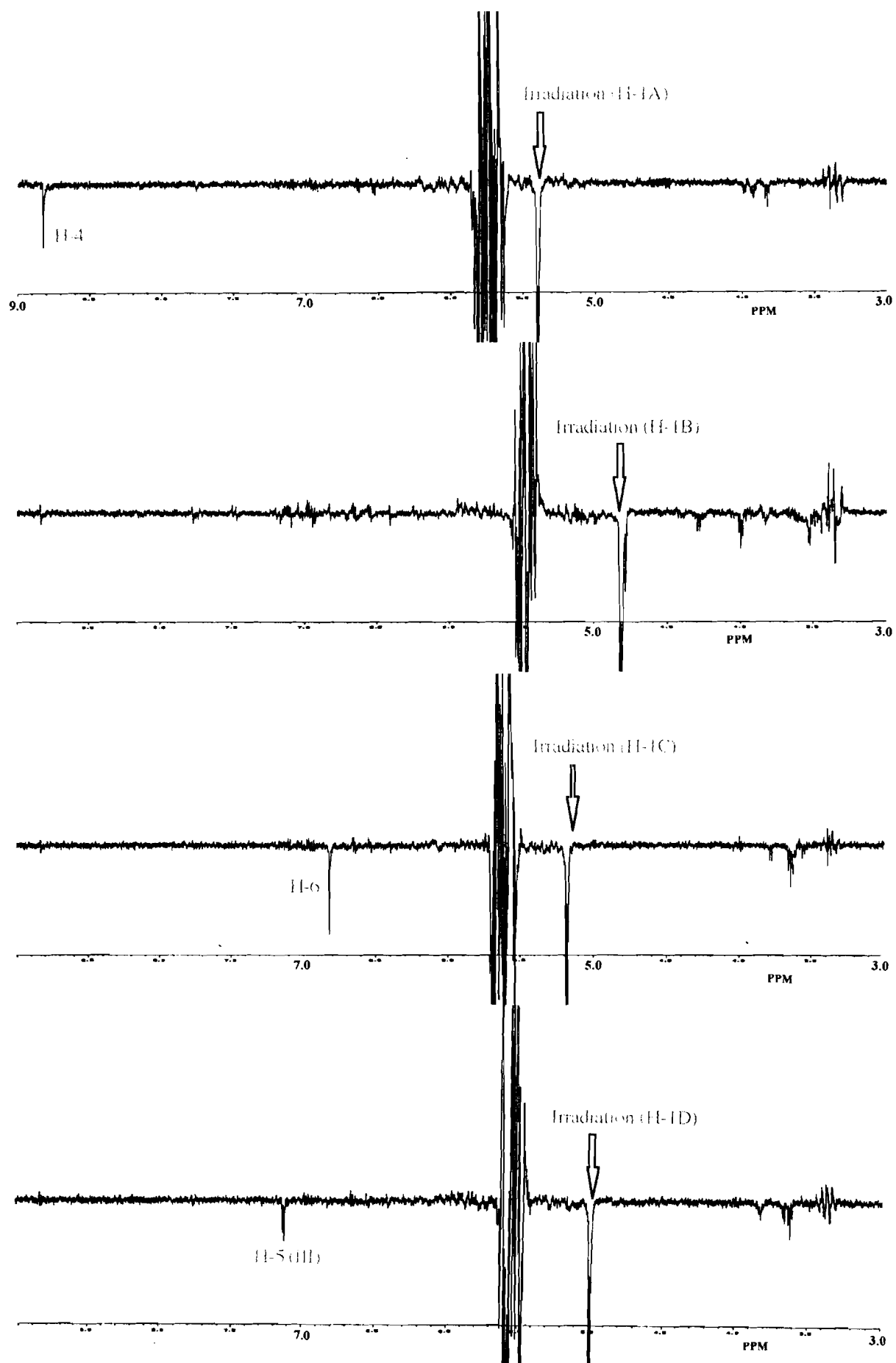


Figure 47. Spectres RMN des effets overhauser (NOEDFF) du composé **8** des fleurs de *I. asarifolia*. Irradiation selective des signaux des protons anomériques (H-1A, H-1B, H-1C, H-1D) des glucosyles

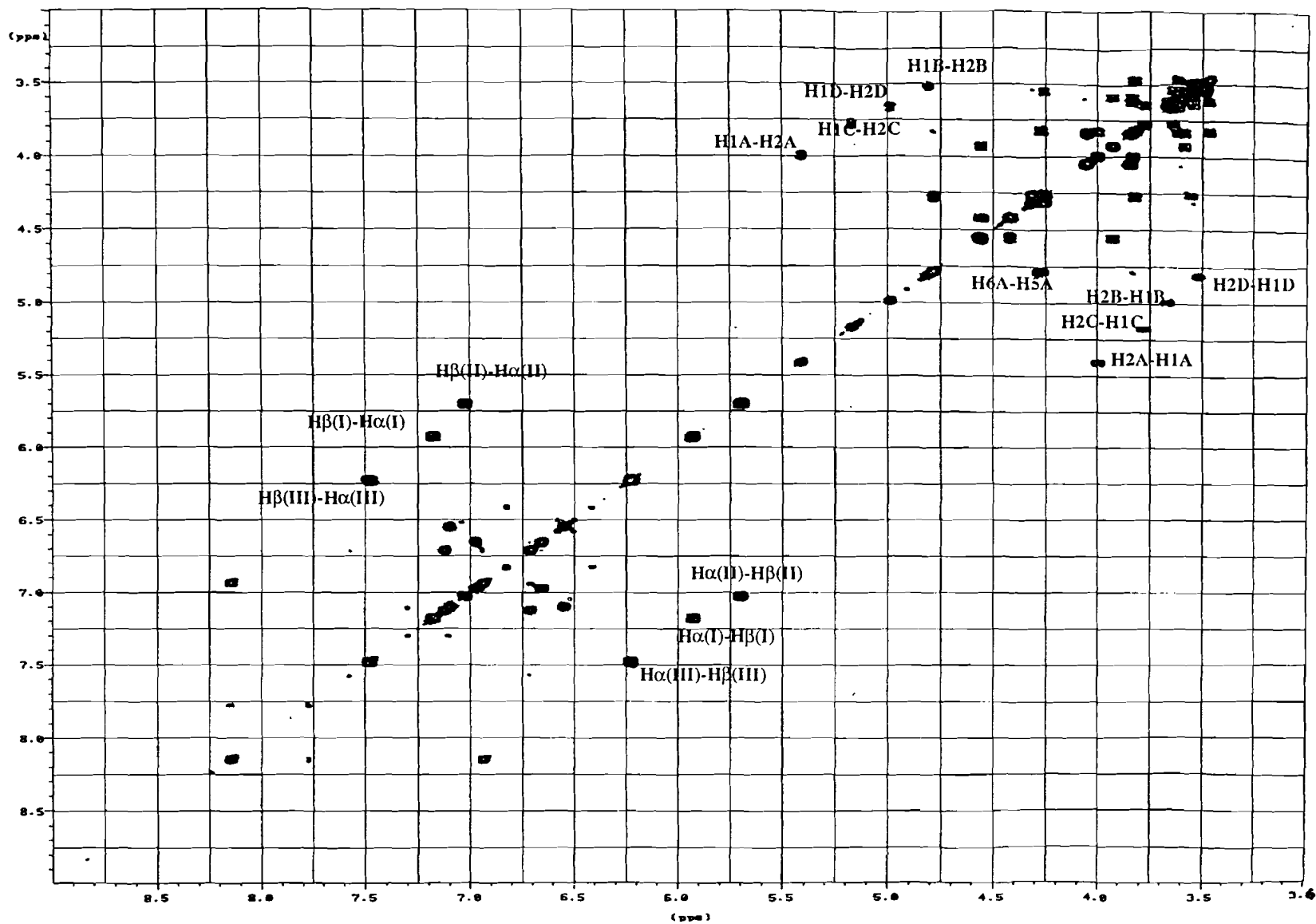
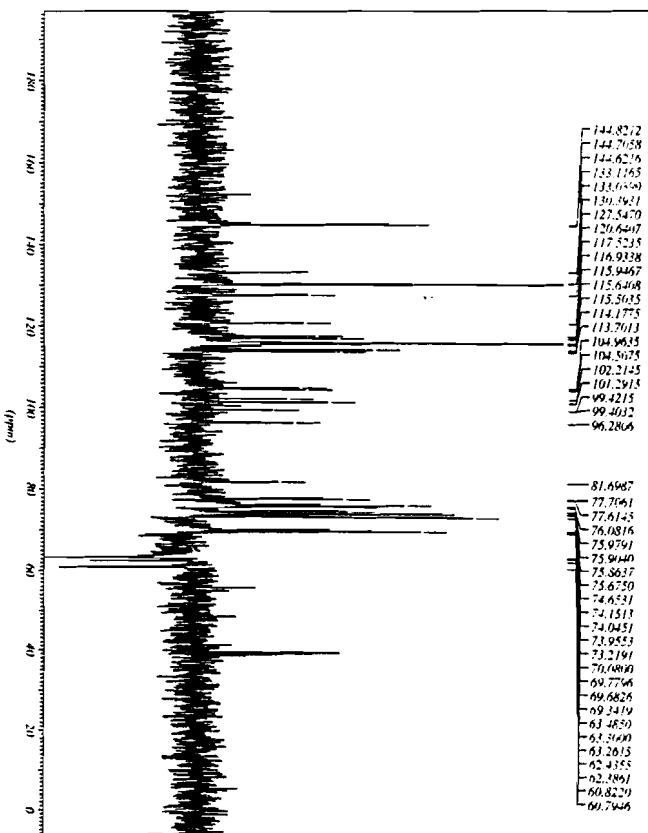
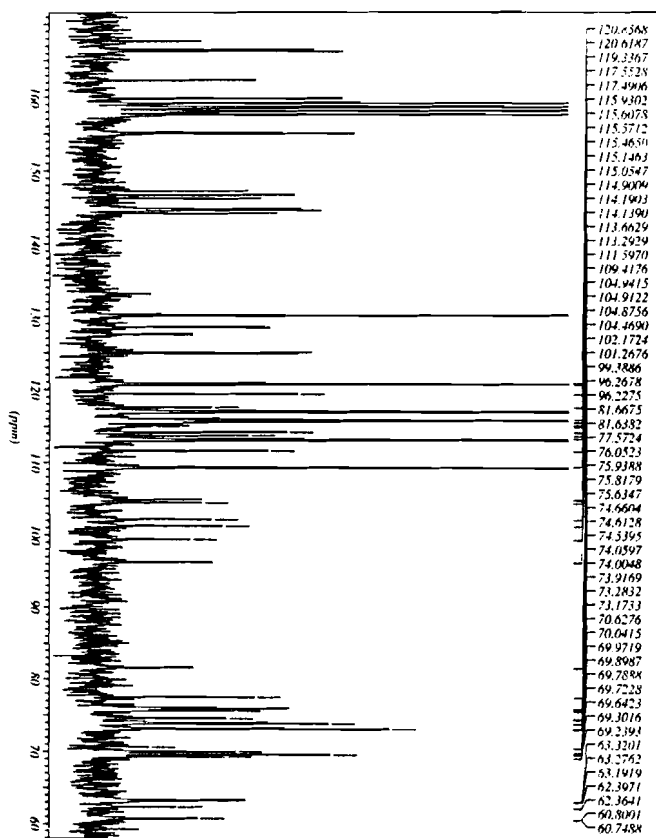


Figure 48. Spectre RMN-COSY 1H-1H du composé **8** des fleurs de *I. asarifolia*.

Figure 49. Spectres RMN-13C [BB (gauche) et DEPT (droite)] du composé **8** des fleurs de *I. asarifolia*.



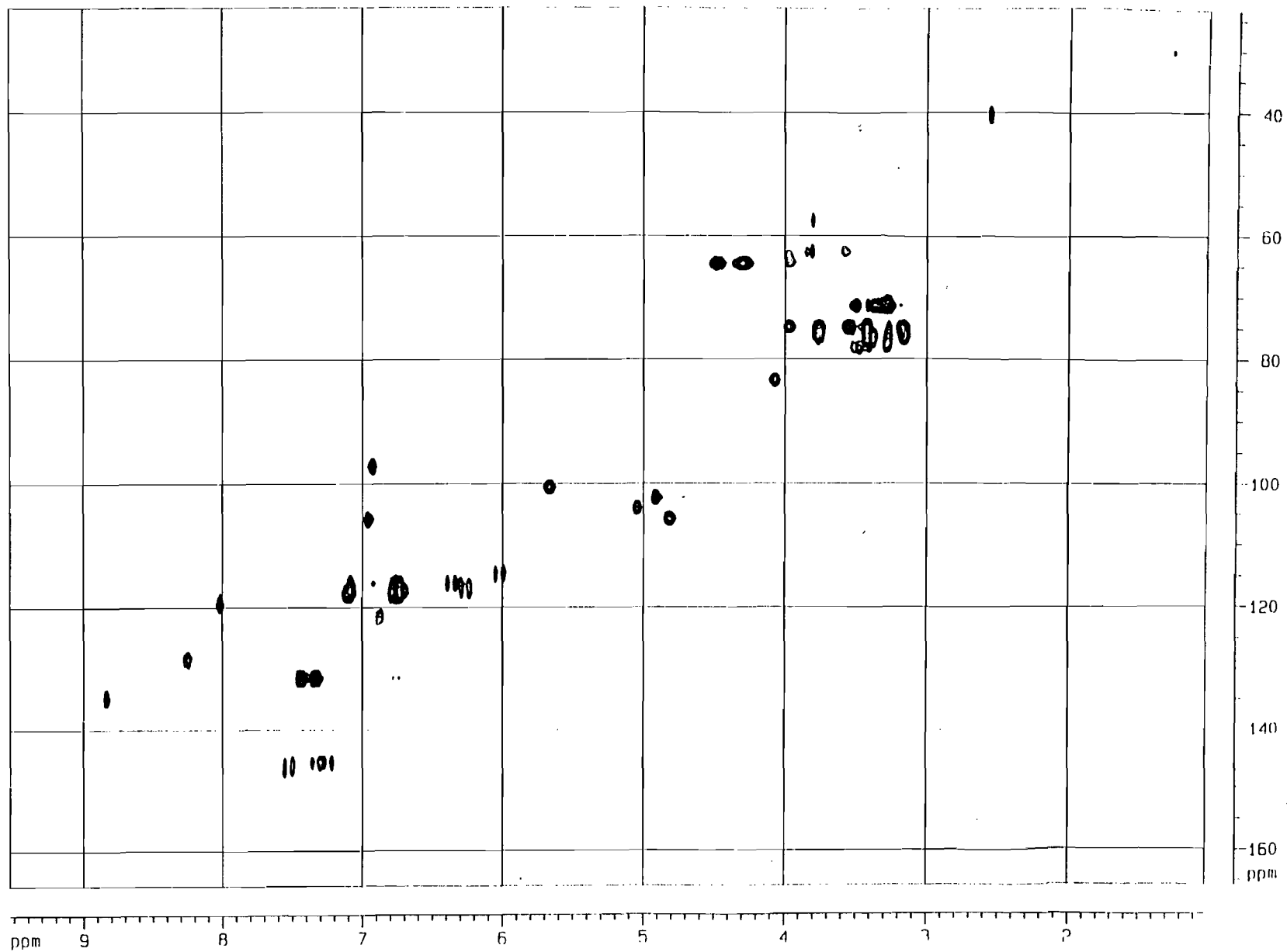


Figure 50. Spectres RMN-HMBC du composé 8 des fleurs de *I. asarifolia*.

concentration (ppm)	DO _{517nm}			
	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>8</u>
0	0,92	0,86	0,86	0,83
3,37	0,76	0,76	0,76	0,77
6,73	0,65	0,66	0,66	0,72
10,04	0,55	0,58	0,57	0,67
13,46	0,46	0,53	0,49	0,62
16,83	0,44	0,45	0,42	0,59
IC ₅₀ (μg/ml) =	18,8	20,7	19,3	34,6

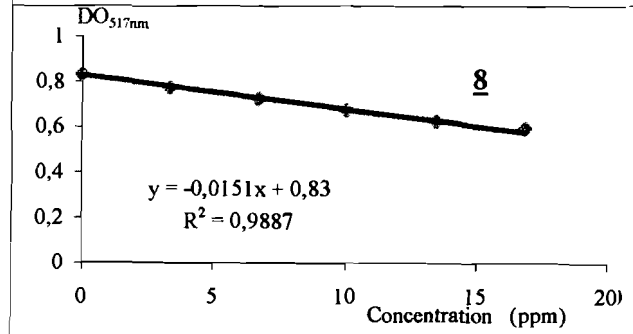
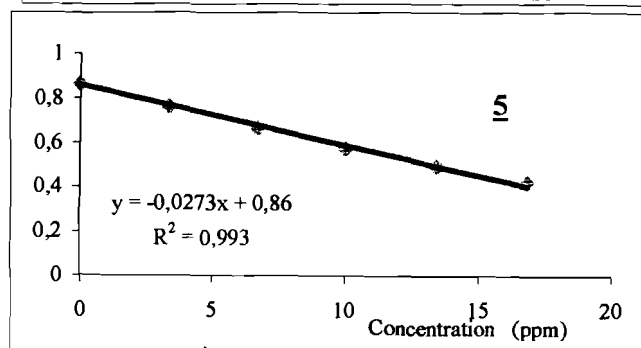
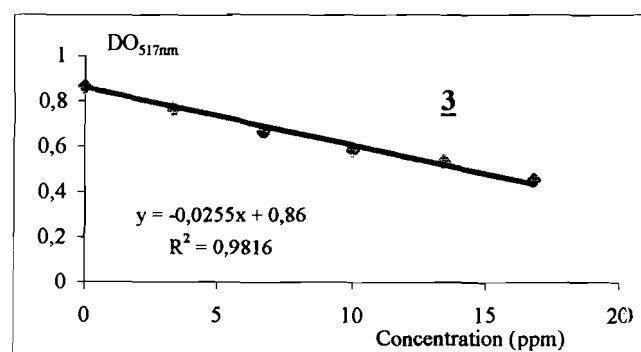
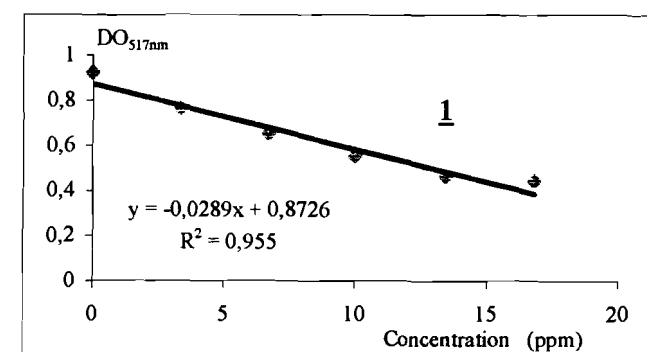


Figure 51. Mesures des activités antioxydantes des 4 anthocyanosides des fleurs de *I. asarifolia*

Tableau 7. Données spectrales et chromatographiques de 4 anthocyanosides des fleurs de *I. asarifolia*

Anthocyanosides	R _f en CCM (R _f x 100)		CLHP t _R (mn)	CPG t _R (min)			Données des spectres électroniques (0,1% MeOH-HCl)			SM-ElectroSpray m/z
	BAW *	EAFW **		α	β	sucres correspondants	λ _{max.} [logε] en nm	E ₄₄₀ /E _{max.vis} (%) [+AlCl ₃] [†]	E _{max.acyle} /E _{max.vis} (%)	
<u>1</u>	24	35	13,21	19,01	20,97	glucosyle	283 [4,40] 295 [4,41] 329 [4,44] 530 [4,44]	12 [+]	100	[M] ⁺ 1097 ; [M-162]935 [M-324]773 ; [M-486]611 [M-648]449 ; [M-810]287
<u>3</u>	30	43	14,96	19,05	21,00	glucosyle	283 [4,52] 295 [4,55] 319 [4,55] 528 [4,49]	12 [+]	100	[M] ⁺ 1081 ; [M-146]935 [M-162]919 ; [M-308]773 [M-470]611 ; [M-632]449 [M-794]287
<u>5</u>	18	28	17,39	18,95	20,94	glucosyle	293 [4,57] 324 [4,52] 531 [4,41]	11 [+]	126	[M] ⁺ 1421 ; [M-162]1259 [M-324]1097 ; [M-486]935 [M-648]773 ; [M-810]611 [M-972]449 ; [M-1434]287
<u>8</u>	24	33	20,20	18,97	20,95	glucosyle	295 312 532	12 [+]	140	[M] ⁺ 1389 ; [M-1162]1227 [M-940]449 ; [M-1102]287

* Adsorbant = cellulose microcristalline F254 (0,1 mm ; Merck), BAW = Butan-1-ol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5), phase supérieure ; ** Adsorbant = silice 60 (0,1 mm ; Merck), EFW = Acétate d'éthyle - acide formique - acide acétique - eau (100 : 11 : 11 : 26)^{118, 19, 30, 321} ; † Addition de 2-3 gouttes de chlorure d'aluminium : + = effet bathochrome ; 0 = aucun d'effet.

Tableau 8. Données RMN- ^1H et ^{13}C de 4 anthocyanosides des fleurs de *I. asarifolia*

Attribution *	H-x	<u>1</u>		<u>3</u>		<u>5</u>		<u>8</u>	
		δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm) **
Aglycone	2		165,0		164,8		165,2		162,3
	3		145,0		145,0		145,5		144,1
	4	8,84 ; s	138,7	8,85 ; s	130,9	8,77 ; s	129,2	8,83 ; s	133,1
	5		156,9		156,7		156,9		155,2
	6	6,85 ; d 1,8	105,6	6,86 ; d 1,8	105,6	6,77 ; d 1,9	105,4	6,82 ; d 2,0	104,5
	7		170,0		170,0		170,1		167,6
	8	6,83 ; d 1,8	97,6	6,84 ; d 1,8	97,6	6,41 ; d 1,9	97,5	6,41 ; d 2,0	96,3
	9		156,6		157,1		156,7		155,1
	10		113,0		113,0		113,0		111,6
	1'		120,0		120,7		120,7		119,3
	2'	7,92 ; d 1,8	118,6	7,92 ; d 1,8	118,5	7,76 ; d 1,9	118,6	7,77 ; 2,3	117,5
	3'		147,3		147,4		147,3		146,6
	4'		156,3		156,4		156,5		155,0
	5'	7,00 ; d 8,4	117,5	7,00 ; d 8,4	117,5	6,92 ; d 8,6	117,7	6,94 ; 8,6	116,9
6'	8,19 ; dd 8,4 ; 1,8	129,1	8,22 ; dd 8,4 ; 1,8	129,2	8,08 ; dd 8,6 ; 1,9	129,2	8,15 ; dd 2,3 ; 8,6	127,5	

* Attributions faites d'après COSY, TOCSY 1D, 13C (BB & DEPT) HMBC et d'après la littérature [33, 27-29, 53-61]

** Solvant : DMSO_{d6} - TFA_{d1}

Tableau 8. (Suite)

Attribution*	H-x	1		3		5		8	
		δ_H (ppm) / J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) / J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) / J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) / J (Hz)	δ_C (ppm) **
Glucose A	1	5,36 ; d 7,4	102,9	5,32 ; d 7,2	102,9	5,36 ; d 7,8	102,6	5,41 ; d 7,2	101,3
	2	4,00 ; dd 7,4 ; 9,0	83,7	3,98 ; dd 7,2 ; 9,0	83,9	3,98 ; dd 7,8 ; 9,0	84,1	4,00 ; dd 7,2 ; 9,0	81,7
	3	3,81 ; t 9,0	76,0	3,78 ; t 9,0	75,9	3,85 ; dd 9,0 ; 8,4	76,1	3,83 ; t 9,0	74,7
	4	3,60 ; dd 9,0 ; 9,6	71,1	3,59 ; dd 9,0 ; 9,6	71,2	3,58 ; dd 8,4 ; 9,6	71,0	3,59 ; dd 9,0 ; 9,6	69,3
	5	3,76 ; m 9,6 ; 5,5	77,7	3,74 ; m 9,6 ; 5,4	77,7	3,90 ; m 9,6 ; 7,2	77,7	3,93 ; m 2,3 ; 8,6 ; 9,6	75,9
	6a	4,45 ; d 5,5 ; 12,0	64,1	4,43 ; dd 5,4 ; 12,0	64,1	4,50 ; dd 7,2 ; 10,6	64,6	4,56 ; dd 8,6 ; 12,0	63,3
6b	4,11 ; d 4,4	64,1	4,10 ; d 12,0	64,1	4,38 ; d 10,6	64,6	4,42 ; dd 2,3 ; 12,0	63,3	
Glucose B	1	4,81 ; d 7,0	106,0	4,79 ; d 8,4	106,1	4,80 ; d 7,8	106,1	4,81 ; d 7,5	104,9
	2	3,52 ; dd 7,0 ; 9,0	75,3	3,50 ; dd 8,4 ; 9,6	75,4	3,50 - 3,53 ; m	75,4	3,45 - 3,6 ; m	73,2
	3	3,50 ; dd 9,0 ; 6,8	77,3	3,44 ; dd 9,6 ; 7,2	77,4	3,50 - 3,53 ; m	77,3	3,45 - 3,6 ; m	75,7
	4	3,46 ; dd 6,8 ; 6,0	71,2	3,46 ; dd 7,2 ; 6,6	71,1	3,48 ; dd 9,6 ; 9,0	71,6	3,48 ; dd 9,0 ; 9,6	69,7
	5	3,48 ; dd 6,0 ; 2,4	78,6	3,52 ; dd 6,6 ; 3,4	78,7	3,5 - 3,53 ; m	78,6	3,54 ; m	77,7
	6	4,32 ; dd 2,4 ; 12,0	63,9	4,24 ; dd 3,4 ; 12,0	64,0	4,34 ; d 12,0	64,0	3,32 ; dd 2,0 ; 12,0	62,4
		4,28 ; d 12,0	63,9	4,24 ; d 12,0	64,0	4,23 ; d 12,0	64,0	3,27 ; d 12,0	62,4
Glucose C	1	5,16 ; d 7,6	102,4	5,12 ; d 7,8	106,2	5,14 ; d 7,8	102,3	5,17 ; d 7,8	99,4
	2	3,80 ; dd 7,6 ; 9,0	74,5	3,76 ; dd 7,8 ; 9,0	75,5	3,76 ; dd 7,8 ; 9,0	74,5	3,77 ; dd 7,8 ; 9,0	73,2
	3	6,65 ; t 9,0	76,0	3,61 ; t 9,0	76,4	3,64 ; dd 9,0 ; 8,4	75,9	3,64 ; dd 9,0 ; 9,6	74,0
	4	3,53 ; dd 9,0 ; 9,6	71,4	3,50 ; dd 9,0 ; 9,6	71,4	3,54 ; dd 8,4 ; 9,6	71,4	3,54 ; t 9,0	69,7
	5	3,60 ; m 9,6 ; 2,4	77,8	3,57 ; m 9,6 ; 2,4	77,8	3,61 ; m 9,6 ; 3,5	77,6	3,62 ; m 2,3 ; 9,0	75,8
	6a	3,73 ; dd 2,4 ; 12,0	62,4	3,79 ; dd 2,4 ; 12,0	62,5	3,84 ; dd 3,5 ; 11,4	62,4	4,05 ; dd 2,3 ; 12,0	60,8
6b	4,02 ; d 12,0	62,4	4,03 ; d 12,0	62,5	4,05 ; d 11,4	62,4	3,84 ; d 12,0	60,8	
Glucose D	1					4,94 ; d 7,8	104,1	4,99 ; d 7,8	102,2
	2					3,64 ; dd 7,8 ; 9,0	74,7	3,67 ; dd 7,8 ; 9,0	73,2
	3					3,63 ; t 9,0	75,7	3,62 ; dd 9,0 ; 9,6	73,9
	4					3,45 ; dd 9,0 ; 9,6	72,2	3,47 ; t 9,0	70,1
	5					3,80 ; m 9,6 ; 7,2	78,0	3,82 ; m 2,0 ; 5,4 ; 9,0	76,1
	6a					4,26 ; dd 7,2 ; 10,6	65,0	4,78 ; dd 2,0 ; 12,0	63,5
6b					4,77 ; d 10,6	65,0	4,4,28 ; dd 5,4 ; 9,0	63,5	

* Attributions faites d'après COSY, TOCSY 1D, 13C (BB & DEPT) HMBC et d'après la littérature [33, 27-29, 53-61]

** Solvant : DMSO_{d6} - TFA_{d1}

Tableau 8. (suite)

Attribution*	H-x	1		3		5		8	
		δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)**
Acyle I		E-Caféyle		E-Caféyle		E-Caféyle		E-Caféyle	
	1		127,3		127,3		130,4		127,5
	2	6,82 ; d 1,8	115,2	6,63 ; d 1,8	115,2	6,90 ; d 1,9	115,4	6,95 ; d 2,0	115,6
	3		146,4		146,4		148,4		144,6
	4		149,5		149,5		149,5		147,2
	5	6,72 ; d 8,4	116,5	6,75 ; d 8,4	116,5	7,07 ; d 8,6	116,5	7,12 ; d 8,6	115,9
	6	6,64 ; dd 8,4 ; 1,8	123,4	6,68 ; dd 1,8 ; 8,4	123,3	6,64 ; dd 8,6 ; 1,9	122,8	6,71 ; dd 2,0 ; 8,6	120,6
	α	5,94 ; d 16,0	114,4	5,96 ; d 16,0	114,4	5,85 ; d 16,0	114,8	5,94 ; d 15,7	114,2
	β	7,18 ; d 16,0	147,1	7,20 ; d 16,0	147,1	7,11 ; d 16,0	146,6	7,18 ; d 15,7	146,2
	C=O		169,0		169,0		168,6		166,3
Acyle II		E-Caféyle		E- <i>p</i> -Coumaryle		E-Caféyle		E- <i>p</i> -Coumaryle	
	1		127,0		126,4		127,0		124,9
	2	6,60 ; d 1,8	115,0	7,03 ; d 8,4	130,9	6,55 ; d 1,9	115,1	6,97 ; d 8,6	130,1
	3		146,4	6,67 ; d 8,4	116,8		148,0	6,55 ; d 8,6	115,8
	4		149,3		161,0		149,1		159,7
	5	6,61 ; d 8,4	116,3	6,67 ; d 8,4	116,8	6,60 ; d 8,2	116,3	6,55 ; d 8,6	115,8
	6	6,50 ; dd 8,4 ; 1,8	122,8	7,03 ; d 8,4	130,9	6,44 ; dd 8,2 ; 1,9	121,0	6,97 ; d 8,6	130,1
	α	5,75 ; d 16,0	114,3	5,81 ; d 16,0	114,3	5,63 ; d 16,0	114,2	5,70 ; d 15,7	113,7
	β	7,00 ; d 16,0	146,6	7,10 ; d 16,0	146,3	6,93 ; d 16,0	146,0	7,03 ; d 15,7	144,5
	C=O		168,6		168,7		168,5		166,2
Acyle III						E-3,5 dihydroxycinnamyle		Coumaryle	
	1						127,6		125,0
	2					6,51 ; s	122,8	7,10 ; d 8,6	130,1
	3						146,6	6,65 ; d 8,6	115,8
	4					6,81 ; s	139,0		159,8
	5						146,6	6,65 ; d 8,6	115,8
	6					6,51 ; s	122,8	7,10 ; d 8,6	130,1
	α					6,16 ; d 16,0	115,1	6,23 ; d 15,7	115,5
	β					7,39 ; d 16,0	146,8	7,48 ; d 15,7	144,8
	C=O						168,9		166,5

* Attributions faites d'après COSY, TOCSY 1D, 13C (BB & DEPT) HMBC et d'après la littérature [33, 27-29, 53-61]

** Solvant : DMSO_{d6} - TFA_{d1}

5.3 – Conclusion

Les composés **1**, **3**, **5** et **8** isolés des fleurs de *Ipomoea asarifolia* ont été identifiés comme étant la cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)]-(6-*O*-*E*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside, la cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-coumaryl- β -*D*-glucopyranosyl)]-(6-*O*-*E*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside, la cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)]-{6-*O*-[4-*O*-(6-*O*-*E*-3,5-dihydroxycinnamyl)- β -*D*-glucopyranosyl)-*E*-caféyl]- β -*D*-glucopyranosyl}-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside et la cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-coumaryl- β -*D*-glucopyranosyl)]-{6-*O*-[4-*O*-(6-*O*-*E*-coumaryl)- β -*D*-glucopyranosyl)-*E*-caféyle]- β -*D*-glucopyranosyl}-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside, respectivement. Ce sont des structures moléculaires nouvelles ^[52]. En outre, les anthocyanosides acylés semblent être caractéristiques des espèces d'*Ipomoea* ^[47, 48].

Les mesures des activités antioxydantes (Fig. 51, p.81) de ces molécules indiquent que les composés **1**, **3** et **5** possèdent des activités voisines (IC50 = 18,8, 19,3 et 20,7 μ g / ml) tandis que le composé **8** montre une activité nettement plus faible (IC50 = 34,6 μ g / ml). Ce dernier est beaucoup moins actif que la vitamine C alors que les premiers sont plus actifs. La présence d'un coumaryle en position terminale d'un anthocyanoside semble avoir pour effet la diminution de l'activité antioxydante de celui-ci.

La teneur estimée en anthocyanes totales est de 2,5 g pour 100 g de matière sèche. Les fleurs de *Ipomoea asarifolia* se positionnent alors comme une source potentielle d'anthocyanosides acylés.

6 – Étude comparative des activités antioxydantes.

Tableau 10. Ensemble des activités antioxydantes mesurées

Matériel végétal	composés	IC ₅₀ (en ppm)	Teneur * (%)
<i>Terminalia catappa</i>	<u>1</u> cyanidine 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	18,7	0,4
<i>Adenium obesium</i>	<u>2</u> cyanidine 3- <i>O</i> -(4- <i>O</i> - α -L-rhamnosyl)- β -D-galactopyranoside	38,8	0,6
<i>Jatropha integrerrima</i>	<u>1</u> cyanidine 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	23,6	2,4
	<u>2</u> la cyanidine 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside,	27,5	
<i>Ipomoea asorifolia</i>	<u>1</u> cyanidine 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -caféyl- β -D-glucopyranosyl)]-(6- <i>O</i> - <i>E</i> -caféyl- β -D-glucopyranosyl)-5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	18,8	2,5
	<u>3</u> cyanidine 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaryl- β -D-glucopyranosyl)]-(6- <i>O</i> - <i>E</i> -caféyl- β -D-glucopyranosyl)-5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	20,7	
	<u>5</u> cyanidine 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -caféyl- β -D-glucopyranosyl)]-{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> -3,5-dihydroxycinnamyl)- β -D-glucopyranosyl]- <i>E</i> -caféyl]- β -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	19,3	
	<u>8</u> cyanidine 3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> -coumaryl- β -D-glucopyranosyl)]-{6- <i>O</i> -[4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> -coumaryl)- β -D-glucopyranosyl]- <i>E</i> -caféyle]- β -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	34,6	
Référence	Acide Ascorbique	22,0	

* Teneur estimée en anthocyanes totales pour 100 g de matière sèche

Nos travaux nous ont permis d'identifier au total dix molécules anthocyaniques dont 4 sont des anthocyanosides acylés de masse moléculaire élevée. Ces derniers sont de nouvelles structures et deux d'entre elles ont fait l'objet d'une publication ^[52].

Les mesures des activités antioxydantes sur les composés majoritaires indiquent que certains d'entre eux sont de potentiels antioxydants. En effet, les composés 1 de *Terminalia catappa*, 1 et 2 de *Jatropha integrerrima*, 1, 3 et 5 de *Ipomoea asarifolia* présentent des activités légèrement supérieures à celle de la vitamine C qui est un antioxydant connu et souvent pris comme référence.

Il apparaît que l'activité antioxydante décroît lorsque le nombre de substituants glucosyles en position 3 de l'aglycone augmente. Ceci est en accord avec les observations faites par Metche (1988) ^[62]. Par contre l'activité croît lorsque l'anthocyanoside est acylé en position terminale par l'acide caféique et/ou l'acide 3, 5-dihydroxycinnamique. On observe un effet contraire en présence de l'acide coumarique en position terminale. Le nombre d'hydroxyle en position terminale de l'anthocyanoside acylé influence fortement l'activité antioxydante de celui-ci. Si l'activité est d'autant plus grande que le nombre d'hydroxyle sur l'acyle en position terminale est plus élevé, l'acylation d'un anthocyanoside par l'acide syringique augmenterait son activité antioxydante.

Les anthocyanosides acylés étant relativement plus stable ^[63-70] que leurs homologues non acylés, leurs acylations, surtout en position terminale, présente donc un avantage certain.

CHAPITRE II

PERSPECTIVES

CHAPITRE II : PERSPECTIVES

1 - Sources potentielles et utilisations des anthocyanes au Burkina Faso

Même si autrefois les anthocyanes ont fait l'objet d'un usage quelque peu inconscient, soit dans la coloration des aliments, soit dans la pharmacopée traditionnelle ^[35, 35a], il faut noter que ces composés ne sont pas encore rentrés dans la vie quotidienne moderne. La stabilité faible et le coût de production élevé de ces composés font que ces derniers semblent très peu intéressants pour l'industrie. Au Burkina Faso, l'usage des colorants anthocyaniques semble plutôt rare.

Toutefois, on peut citer l'usage du colorant des gaines des tiges du sorgho rouge dans le tannage et la coloration des cuirs et peaux, comme des pierres à lécher, etc. Le colorant de cette partie de la plante a été identifié et une méthode dosage et d'extraction a été mise au point par Kouda-Bonafos ^[5] et Sérémé ^[5a]. Jusqu'à nos jours, la gaine de la tige de *S. caudatum* constitue la seule source de ce colorant au Burkina Faso. Jaune en milieu acide, cette molécule donne une coloration rouge en milieu basique. Dans les habitudes alimentaires, la couleur rouge est préférée à celle jaune. Les aliments étant généralement acides, ce colorant s'avère moins intéressant par rapport aux pigments rouges en milieu acide. Même si ces derniers sont abondants dans la nature, ils sont plus difficiles à obtenir à l'état semi-purifié. De plus leur temps de demi-vie en milieu aqueux est plus court ^[71].

Un des colorants est particulièrement consommé au Burkina Faso par l'intermédiaire d'une boisson locale très populaire : le «bissap». En effet, les calices des fleurs de *H. sabdariffa* qui entrent principalement dans la fabrication du «bissap» doit sa couleur rouge exclusivement aux anthocyanes d'après Du et Francis (1973) ^[7] ; ce qui a été vérifié sur la même espèce récoltée au Burkina

CHAPITRE II : PERSPECTIVES

1 - Sources potentielles et utilisations des anthocyanes au Burkina Faso

Même si autrefois les anthocyanes ont fait l'objet d'un usage quelque peu inconscient, soit dans la coloration des aliments, soit dans la pharmacopée traditionnelle ^[35, 35a], il faut noter que ces composés ne sont pas encore rentrés dans la vie quotidienne moderne. La stabilité faible et le coût de production élevé de ces composés font que ces derniers semblent très peu intéressants pour l'industrie. Au Burkina Faso, l'usage des colorants anthocyaniques semble plutôt rare.

Toutefois, on peut citer l'usage du colorant des gaines des tiges du sorgho rouge dans le tannage et la coloration des cuirs et peaux, comme des pierres à lécher, etc. Le colorant de cette partie de la plante a été identifié et une méthode dosage et d'extraction a été mise au point par Kouda-Bonafos ^[5] et Sérémé ^[5a]. Jusqu'à nos jours, la gaine de la tige de *S. caudatum* constitue la seule source de ce colorant au Burkina Faso. Jaune en milieu acide, cette molécule donne une coloration rouge en milieu basique. Dans les habitudes alimentaires, la couleur rouge est préférée à celle jaune. Les aliments étant généralement acides, ce colorant s'avère moins intéressant par rapport aux pigments rouges en milieu acide. Même si ces derniers sont abondants dans la nature, ils sont plus difficiles à obtenir à l'état semi-purifié. De plus leur temps de demi-vie en milieu aqueux est plus court ^[71].

Un des colorants est particulièrement consommé au Burkina Faso par l'intermédiaire d'une boisson locale très populaire : le «bissap». En effet, les calices des fleurs de *H. sabdariffa* qui entrent principalement dans la fabrication du «bissap» doit sa couleur rouge exclusivement aux anthocyanes d'après Du et Francis (1973) ^[7] ; ce qui a été vérifié sur la même espèce récoltée au Burkina

Faso au cours de nos investigations antérieures ^[8]. Les techniques d'extraction domestiques sont variées et ne garantissent pas toujours la stabilité des pigments originaux. En effet, l'extraction est le plus souvent effectuée dans un bain d'eau bouillante. La présence d'acides organiques dans le matériel végétal contribue à acidifier la solution et provoque ainsi l'hydrolyse des anthocyanosides. Ceci conduit à un taux très élevé d'aglycones (delphinidine et cyanidine) qui possèdent un temps de demi-vie particulièrement court à température ambiante, même si son pouvoir colorant semble plus élevé. L'extraction à chaud a l'avantage d'être rapide et de stériliser la boisson. L'extraction à température ambiante peut prendre 12 à 24 heures, voire plus. Elle a l'avantage de réduire les risques d'hydrolyse et l'inconvénient de fournir une boisson non stérile. De plus, les risques de fermentation spontanée sont énormes. D'après nos investigations antérieures, les calices des fleurs de *H. sabdariffa* paraissent être de loin la principale source potentielle de pigments anthocyaniques (1500 mg de pigment majoritaire pour 100 g de matière séchée) au Burkina Faso utilisable dans l'alimentation humaine. Aussi, pour une exploitation semi-industrielle des boissons locales à base des calices de cette plante, il serait souhaitable de faire une extraction à froid suivie d'une pasteurisation pour éviter une trop grande perte des anthocyanes. L'obtention des concentrés (sirops) pourrait passer par une concentration sous pression réduite. Pour cela, il serait préférable de macérer dans l'éthanol - acide acétique et de réajuster, au besoin, acidité du sirop et si possible de le conserver au frais.

Nous pouvons également citer l'épicarpe du fruit de *L. microcarpa* (500 mg de pigment majoritaire pour 100 g de matière sèche) ^[12] qui est très consommé dans les campagnes et les villes.

D'autres végétaux tels que les fleurs de *I. asarifolia*, *J. integuerrima*, *A. obesum*, etc. pourraient être cités. Néanmoins, des études toxicologiques sont nécessaires pour les plantes qui n'entrent pas dans l'alimentation humaine.

2 Structure et activités antioxydantes

Les composés isolés de *T. catappa*, *A. obesum* et *J. integrissima* sont des dérivés 3-O-glycosides de la cyanidine. D'après les données du Tableau 10, on observe que la présence de deux sucres sur cette position diminue considérablement l'activité antioxydante de l'anthocyane. Par contre la présence de certains acyles phénoliques, sur ces sucres semble augmenter cette activité.

Nos travaux futurs consisteront à élucider d'avantage cette relation entre la structure de l'anthocyanoside et son activité antioxydante. Cela permettra de prévoir les structures d'anthocyanosides les plus prometteurs.

L'étude des activités antioxydantes des huit composés majoritaires indique que les composés 2 de *A. obesum*, 2 de *J. integrissima* et 8 de *I. asarifolia* sont très peu actifs par rapport à l'acide ascorbique pris comme référence. Par contre les cinq autres composés sont aussi actifs que l'acide ascorbique (vitamine C). L'étude comparée nous a révélé une éventuelle corrélation entre la structure et l'activité antioxydante de l'anthocyanoside. En effet, le degré d'hydroxylation de l'acyle en position terminale d'un anthocyanoside acylé est très déterminant dans l'activité de celui-ci. Ainsi, plus ce degré est élevé, plus l'activité antioxydante de l'anthocyanoside acylé est grande. Par contre la nature et l'augmentation du nombre de sucres en position 3 d'un anthocyanoside tendent à faire diminuer cette activité. Les anthocyanosides de *I. asarifolia* sont de loin plus intéressants dans la mesure où ceux-ci sont plus stables. Néanmoins, l'usage d'extraits non purifiés des ces substances nécessite des études toxicologiques.

Partie expérimentale

1 - Préparation du matériel végétal

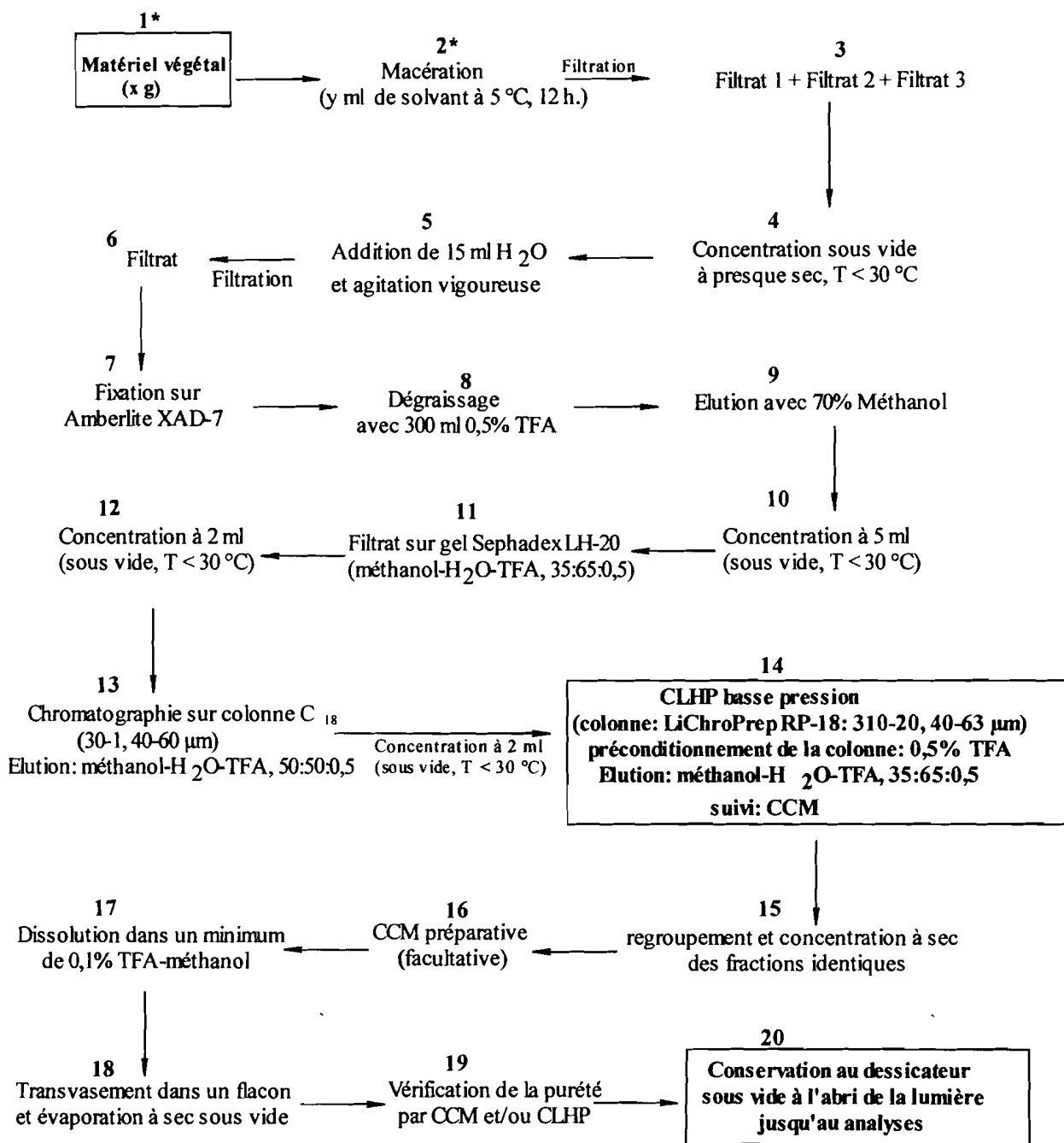
Tableau 11. Matériel Végétal

Plantes	Organes	Lieu de récolte (période)
<i>Terminalia catappa</i>	fruit : épicarpe lyophilisé et broyé	Ouagadougou (1994-1996)
<i>Adenium obesum</i>	fleur lyophilisée et broyée	Ouagadougou (1994-1996)
<i>Jatropha integrerrima</i>	fleur lyophilisée et broyée	Ouagadougou (1994-1996)
<i>Ipomoea asarifolia</i>	fleur lyophilisée et broyée	Ouagadougou (1994-1998)

2 - Extraction et purification des anthocyanes

Protocole général (Fig. 52)

Le protocole en 20 étapes est applicable aux quatre (4) plantes étudiées moyennant de légères modifications suivant le type de matériel végétal et de pigment. L'étape 14 est l'étape ultime de la purification. C'est la séparation du mélange de pigments débarrassé des impuretés gênantes. Pour cela, une colonne commerciale prête à l'emploi est utilisée. L'étape 13 permet d'éviter l'encrassement de la colonne. Cette dernière peut alors être utilisée plusieurs fois.



* pour les valeurs de x et y, voir Tableau 12, p. 96

Figure 52. Schéma de l'extraction à la séparation des pigments purs

Tableau 12. Valeurs des x et y utilisées dans le protocole général d'extraction et de purification. (Fig. 52, p. 95)

	Masse (x g)	Volume de solvant (y ml) :
		Méthanol - TFA 1%
<i>Terminalia catappa</i>	10	100
<i>Adenium Obesum</i>	5	100
<i>Jatropha integrerrima</i>	5	300
<i>Ipomoea asarifolia</i>	5	300

3 - Analyses chimique et spectrales

Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) :

L'extrait brut (le poids du matériel végétal et le volume total d'extrait obtenu sont connus) est concentré et purifié par chromatographie sur colonne C₁₈ (comme à l'étape 13, Fig. 52). Le mélange résultant est évaporé à sec et le résidu est dissous à nouveau dans 0,5% TFA pour la CLHP analytique.

La CLHP analytique a été effectuée d'après la méthode de Gao et Mazza [72, 74] moyennant quelques modifications. Ainsi, un appareil "Waters Associates" en utilisant une colonne C₁₈ (160 x 4 mm, 4µm ; Nova Pak) à 25 °C avec un débit de 0,8 ml mn⁻¹. Le détecteur est muni du système à barrettes de diodes (PAD : "Photodiode Array Detector") opérant à 520 nm. Un système de solvant binaire (A : H₂O-HCO₂H, 60 : 1 ; B : CH₃OH-H₂O-HCO₂H, 75 : 24.5 : 0.5) d'élution par gradient linéaire a été appliqué pendant 20 minutes, de composition variable suivant l'échantillon. Ensuite, une élution isocratique a été maintenue pendant 10 minutes.

Spectrométrie électronique :

Les spectres électroniques ont été obtenus à l'aide des spectrophotomètres :

- DES 190 système à double énergie (Safas)¹ ;
- UV-265 FS (Shimadzu).²

Les spectres ont été enregistrés dans le méthanol - HCl 0,01 N, de 250 à 600 nm. 2 à 3 gouttes de 5% De chlorure d'aluminium dans le méthanol sont additionnées pour mettre en évidence les groupements orthodiphénols éventuellement libres [18, 30].

Pour le dosage des anthocyanes, des dilutions appropriées des extraits bruts précédents (cf. CLHP analytique) ont été obtenues et leur absorbance est lue à la longueur d'onde d'absorption du pigment majoritaire. D'après la loi de Beer-Lambert ($Abs = \epsilon cl$),³ l'épsilon (ϵ) de chaque pigment identifié est calculé. En retour, la concentration (c , en mol.l^{-1}) du pigment est calculée.

Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse a été effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse LC Electrospray (de Micromass) en utilisant le méthanol comme solvant. Les attributions ont été faites à l'aide des données de la littérature [41, 76-81]

Spectrométrie RMN :

Les données RMN ont été obtenues à l'aide des spectromètres Brüker (250 & 300 MHz)² et Varian (600 MHz)² dans le système $\text{CD}_3\text{OD} - \text{TFA}_{-dl}$ (0,5 : 0,1 ml). Un déplacement du signal de l'eau dissoute vers des champs plus faibles est

¹ Pour l'Université de Ouagadougou

² Pour l'Université Libre de Bruxelles

produit par addition de 30 μ l de TFA- d_1 . Au besoin, la manipulation est reprise en utilisant le système DMSO- d_6 -TFA $_{d1}$ (0,5 ; 0,1 ml).

Hydrolyse alcaline : CCM des acides organiques

Pour les anthocyanosides acylés, une hydrolyse alcaline a été effectuée pour l'identification des groupements acyles. Cette hydrolyse a été faite sous atmosphère d'azote suivant la méthode décrite par Terahara et collaborateurs [29, 51]. Une CCM préparative sur silice a été effectuée pour purifier les résidus acyles avant de les identifier par co-chromatographie sur couche mince avec des acides standards. La détection est faite sous lumière UV.

Hydrolyse acide : CPG des sucres

La CPG des sucres a été effectuée d'après une adaptation de la méthode utilisée par sweeley (1963) [75]

Les hydrolyses acides sont obtenues en dissolvant 2 mg de chaque pigment dans le TFA 2N dans une ampoule à sceller. La solution résultante est portée à 110 °C pendant 45 minutes. Après refroidissement, les anthocyanidines sont extraites avec 0,5 ml (2 fois) de 3-méthylbutan-2-ol (alcool isoamylique). La solution aqueuse résultante est évaporée à sec et 0,5 ml de réactif silylant [pyridine/N-(triméthylsilyl)imidazol (2 : 1)] est additionné. La solution est ainsi portée à 60 °C pendant 15 minutes et les dérivés silylés des résidus de sucres sont identifiés par co-chromatographie en phase gazeuse sur une colonne Chromapack CP-Si-8-CB avec des sucres standards.

³ Abs = absorbance ; $\epsilon_{(\lambda)}$ = coefficient d'extinction moléculaire (fonction de la longueur d'onde λ ; l = trajet du faisceau lumineux (en cm))

Activités antioxydantes : Test DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Tableau 13. Préparation des solutions d'extraits

Solution mère : 22,4 mg / 20 ml MeOH soit une concentration de 1400 ppm

Tube N°	Concentration (en ppm)	Solution mère (μ l)	Méthanol (μ l)
1	00,00	00,00	500,00
2	3,37	15,63	484,37
3	6,73	31,25	468,75
4	10,04	46,63	453,37
5	13,46	65,50	434,50
6	16,83	78,13	421,87

◆ préparation de la solution de DPPH : 9,85 mg / 250 ml MeOH, à conserver à l'abri de la lumière ; additionner 6 ml à la solution d'extrait des 6 tubes précédents et lire la Densité Optique au bout de 10 minutes exactement, au spectrophotomètre à 517 nm contre le méthanol comme blanc.

NB : pour un spectrophotomètre muni d'un portoir mono tube, un intervalle d'au moins 1 minute est maintenu entre la lecture des différents tubes.

Établir une courbe de l'absorbance en fonction de la concentration et déterminer la concentration correspondant à une variation d'absorbance de 50 %, comparer cette valeur à celle de l'acide ascorbique (~22 μ g/ml).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Sweeny, J.G. and Iacobucci, G.A. (1981). Synthesis of anthocyanidins-III. Total synthesis of apigeninidin and luteolinidin chlorides. *Tetrahedron*, **37**, 1481.

- 2 - El Hajji, H., Dangles, O., Statoua, A. et Brouillard, R. (juillet 1996). Chlorure de 3'-O- β -D-glucoopyranosyloxyflavylium : synthèse et complexation moléculaire. *Polyphénols Actualité*, **15**, 7.

- 3 - Nip, W.K. and Burns, E.E. (1969). Pigment characterization in grain sorghum. I. Red varieties. *Cereal Chem.* **46**, 490.

- 4 - Nip, W.K. and Burns, E.E. (1971). Pigment characterization in grain sorghum. II. White Varieties. *Cereal Chem.* **48**, 74.

- 5 - Kouda-Bonafos, M., Czyzewska, E., Nacro, M. and Oehlschlager, A.C. (1994) Isolation of apigeninidin from leaf sheaths of *Sorghum caudatum*. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2123.

- 5a - Sérémé, A., Kouda-Bonafos, M. and Nacro, M. (1993). Phenolic Compounds in *Sorghum caudatum* tissues during plant development. *Biomass and Bioenergy*, **4**, 69.

- 6 - Nacro, M. et Millogo-Rasolodimbi J. (1993). *Plantes tinctoriales et plantes à tanins du Burkina Faso*. Éd. Scientifika, Amiens. 86 pages.
- 7 - Du T.C. and Francis, J.F. (1973). Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa*, L.). *Journal of Food Science*, **38**, 810.
- 8 - Palé, E. (1998) Contribution à l'étude des composés anthocyaniques des plantes : cas de *Hibiscus sabdariffa*, *Lannea microcarpa*, *Vigna subterranea* et *Sorghum caudatum* du Burkina Faso. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle de chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Ouagadougou. 115 pages.
- 9 - Morazzoni, P. and Bombardeli, E. (1996). *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia*, **LXVII**, 3
- 10 - Morazzoni, P. and Magistretti, M.J. (1990). Activity of Myrtocyan[®], an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness, *Fitoterapia*, **61**, 13.
- 11 - Bénavent, M.R. (1986). Propriétés pharmacologiques des anthocyanes. Thèse de Doctorat d'État en Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier I. 110 pages.
- 12 - Palé, E., Nacro, M. and Kouda-Bonafos M. (1998) Anthocyanins from fruits of *Lannea microcarpa*. *Trop. Sci.*, **38**, 20.

- 13 – German, B.J. et Dillard, J.C. (1998) Phytochemicals and Targets of Chronic Disease, dans *Phytochemicals – A New Paradigm* – Bidlack, Omaye, Meskin and Jahner Ed., pp. 13-30.
- 14 - Wakabayashi, Y., (1999) Effect of red wine consumption on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in aorta and coronary artery in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4724.
- 15 - Jolts, J., (1999) Le jus de raisin rouge contre l'athérosclérose. *Agence France-Presse*, Washington.
- 16 - Palé, E., Nacro, M., Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastré, R. (1997) Anthocyanins from Bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3359.
- 17 - Palé, E., Kouda-Bonafos, M., Nacro, M., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R. and Ottinger, R. (1997). 7-O-methylapigeninidin, an anthocyanidin from *Sorghum caudatum*. *Phytochemistry*, **45**, 1091.
- 18 - Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Composés phénoliques des végétaux*. Éd. Dunod, Paris. 143.
- 19 - Mazza, G. and Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. CRC Press Ed., Tokyo, 362 pages.

- 20 - Sherwin, R.E. (1990). Antioxidants dans Food Additives. Ed. Branen A.L., Davidson.P.M., Salminen S. pp. 139-91.
- 21 - Gadaw, V.A., Joubert, E. and Hansmann, F.C. (1997) Comparaison of the antioxydant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathu linearis*). *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 632.
- 22 - Sawai, Y. and Sakata, K. (1998) NMR analytical approach to clarify the antioxydative molecular mechanism of catechins using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 111.
- 23 - Ratty, K.A, Sunamoto, J. and Das, P.N. (1988) Interaction of Flavonids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 989.
- 24 - Teguo, W.P., Fauconneau, B., Defieux, G., Huguet, F., Vercauteren, J. and Mérillon, J.-M. (1998) Isolation, identification and activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *J. Nat. Prod.*, **61**, 655.
- 25 - Gamez, J.C.E. and al. (1998) Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 706.
- 26 - Tatsuzawa, F. and al. (1998) Acylated malvidin 3-rutinosides in dusky violet flowers of *Petunia integrifolia* subsp. *Inflata*. *Phytochemistry*, **52**, 351.

- 27 - Terahara, N., Oda, M., Matsui, T., Osajima, Y., Saito, N., Toki, K. and Honda, T. (1996). Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* flowers. *J. Nat. Prod.*, **59**, 139.
- 28 - Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Kenjiro, T. and Osajima, T. (1990). Structure of ternatin A1, the largest ternatin in the major blue anthocyanins from *clitoria ternatea* flowers. *Tetrahedron lett.*, **31**, 2920.
- 29 - Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y. (1990). Acylated anthocyanins of *Clitoria ternatea* flowers and their acyl moieties. *Phytochemistry*, **29**, 949.
- 30 - Francis, F.J. (1982). Analysis of anthocyanins, dans *Anthocyanins as Food Colors*, food and science technology. Markakis, P. Ed, Academic Press, New York . 23.
- 31 - Sherma, J. and Fried, B. (1996). Anthocyanins, dans *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. Vol. 71, 2nd Ed., Dekker, M. Ed., New York. 722.
- 31a - Wagner, H. and Bladt, S. (1996). Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas ; 2nd Ed. (Springer Ed.), 286.
- 32 - Harbone, J.B. (1975). Chromatography of phenolic compounds, dans *Chromatography, a laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic methods*. 3rd Ed., Heftmann, E. Ed., New York. 781.

- 33 - Otake, K., Terahara, N., Saito, N., Toki, K. and Honda, T. (1992). Chemical structure of two anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomea batatas*. *Phytochemistry*, **31**, 2127.
- 34 - Nakatani, N., Kikuzaki, H., Hikita, J., Ohba, M., Inami, O. and Tamura I. (1995). Acylated anthocyanins from fruits of *Sambucus canadensis*, **38**, 755.
- 35 - Kerharo, J. et Adam, J.G. (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. Éd. Vigot Frère, Paris. 1011 pages.
- 35a - Bruneton, J. (1993). Anthocyanosides, dans *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. 2^e éd., Éd. Lavoisier, 30. Paris.
- 36 - Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M. and Suzuki, M. (1996). Triacylated anthocyanins from *Ajuga Reptans* flowers and cell cultures. *Phytochemistry*, **42**, 199.
- 37 - Saito, N., Tatsuzawa, F., Honko, A., Win, W.K., Yokoi, M., Shigihara, A. and Honda, T. (1996). Acylated pelargonidin 3-sambubioside-5-Glucosides in *Matthiola incana*. *Phytochemistry*, **41**, 1613.
- 38 - Johansen, O.P., Andersen, M.O., Nerdal, W. and Aksnes, W.D. (1991). Cyanidin 3-[6-(p-coumaroyl)-2-(xylosyl)-glucoside]-5-glucoside and other anthocyanins from fruits of *Sambucus canadensis*. *Phytochemistry*, **30**, 4137.

- 39 - Lu, S.T., Saito, N., Yokoi, M., Shigihara, A. and Honda, T. (1991). An acylated peonidin glycoside in the violet-blue flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, **30**, 2397.
- 40 - Gläbgen, E.W., Wray, V., Stract, D., Metzger, W.J. and Seitz, U.H. (1992). Anthocyanins from cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Phytochemistry*, **31**, 1593.
- 41 - Madhavi, L.D., Juthangkoon, S., Lewen, K., Berber-Jimenez, D.M. and L.A. M. (1996). Characterisation of anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa Cell Cultures. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1170.
- 42 - Harbone, J. B. (1994) Flavonoids, dans *Dictionnaire of natural products*, **7**, 94.
- 43 - Silverstein-Bassler-Morrill (1991). Chapter six, New dimensions in NMR. Dans *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5th Ed., Fifth Ed., 267.
- 44 - Günter, H. (1993) La spectroscopie RMN. Principes concept et application de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13. Éd. Masson. Paris-Milan-Barcelone. 557 pages.

- 44 - Mabberley, D.J. (1987). *The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants*. Cambridge University Press ; Cambridge.
- 45 - Toki, K, Takeuchi, M., Saito, N. and Honda, T. (1996). Two malonated anthocyanins glycosides in *Ranunculus asiaticus*. *Phytochemistry*, **42**, 1055.
- 46 - Toki, K., Saito, N., Kuwano, H., Terahara, N. and Honda, T. (1995). Acylated anthocyanins in *Verbena flowers*. *Phytochemistry*, **38**, 515.
- 47 - Pomilo, A.B. and Sproviero, J.F. (1972). Acylated anthocyanins from *Ipomea cairica*. *Phytochemistry*, **11**, 2323.
- 48 - Pomilo, A.B. and Sproviero, J.F. (1972). Acylated anthocyanins from *Ipomea cairica*. *Phytochemistry*, **11**, 1125.
- 49 - Gupta, O.C.D., Gupta, R. and Gupta, P.D. (1980). Chemical examination of flowers of *Ipomea fistulosa*. *Planta Med.*, **38**, 147.
- 50 - Price, L.C. and Wrolstard, E.R. (1995). Anthocyanin pigments of royal okanogan huckleberry juice. *Journal of Food Science*, **60**, 369.
- 51 - Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y. (1990). Further structural elucidation of the antocyanin, deacylternatin, from *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, **29**, 3686.

- 52 - Palé, E., Nacro, M., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R. and Ottinger, R. (1998) Acylated anthocyanins from the flowers of *Ipomoea asarifolia*. *Phytochemistry*, **48**, 1433.
- 53 - Nilsson, E. (1973). Studies of flavilium compounds. Application of proton NMR spectroscopy to the analysis of anthocyanidin pigments. *Chemica Scripta*, **4**, 49.
- 54 - Goto T., Takase, S. and Kondo, T. (1978). PMR spectra of natural acylated anthocyanins. Determination of stereostructure of awobanin, shisonin and violanin. *Tetrahedron Lett*, 2413.
- 55 - Kouda-Bonafos, M., Nacro, M. and Ancian, B. (1996). Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts of a natural anthocyanidin, Apigeninidin, using two-dimensional COLOC and HMBC techniques. *Magn. Reson. Chem.*, **34**, 389.
- 57 - Saito, N., Abe, K., Timberlake, F.C. and Bridle, P. (1985). Acylated delphinidin glucosides and flavonols from *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, **24**, 1583.
- 58 - Saito, N, Osawa, Y. and Hayashi, K. (1971). Platyconin, a new anthocyanin in Chinese Bell-Flower, *Platycodon grandiflorum*, *Phytochemistry*, **10**, 445.

- 59 - Goto, T., Kondo, T., Tumara, H., Imagawa, H. Iino, A. and Takeda, K. (1982). Structure of gentiodelphin, an acylated anthocyanin isolated from *Gentiana makinoi*, that is stable in diluted aqueous solution. *Tetrahedron lett.*, **23**, 3695.
- 59 - Kondo, T., Yamashita, J., Kawahari, K. and Goto, T. (1989). Structure of lobelinin A and B, novel anthocyanin acylated with three or four different organic acids, respectively. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 6055.
- 60 - Idaka, E., Ohashi, Y., Ogawa, T., Kondo, T. and Goto, T. (1987). Structure of zebrinin, a novel acylated anthocyanin isolated from *Zebrina pendula*. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1901.
- 61 - Saito, N., Abe, K., Honda, T., Timberlake, C.F. and Bridle, P. (1985). Acylated delphinidin glucosides and flavonols from *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, **24**, 1583.
- 62 - Metche, M. (1988) Rôle des flavonoïdes dans les aliments. Groupe Polyphénols, **14**, 119.
- 63 - Figueredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O. and Brouillard R. (1996). New aspects of anthocyanins complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss. *Phytochemistry*, **41**, 301.
- 64 - Dangles, O., Saito, N. and Brouillard, R. (1993). Anthocyanin Intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, **34**, 119.

- 65 - Wigand, M.C., Dangles, O. and Brouillard, R. (1992). Complexation of a fluorescent anthocyanin with purines and polyphenols. *Phytochemistry*, **31**, 4317.
- 66 - Dangles, O., Wigand, M.C. and Brouillard, R. (1992). Anthocyanin anticopigment effect. *Phytochemistry*, **31**, 3811.
- 67 - Osawa, Y. (1982). Copigmentation of anthocyanins, dans *Anthocyanins as Food Colors*, food and science technology. Markakis, P. Ed., Academic Press, New York. 41.
- 68 - Hoshino, T, Matsumoto, U. and Goto, T. (1987). Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochemistry*, **20**, 1971.
- 69 - Hoshino, T, Matsumoto, U., Goto, T. and Harada, N. (1982). Evidence for the Self-association of some anthocyanins. IV. PMR spectrometric evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 433.
- 70 - Hoshino, T. (1991). An approximate estimate of Self-association constants and the self staking conformation of malvin quinoidal boxes studied by H-NMR. *Phytochemistry*, **30**, 2049.
- 71 - Iacobucci, G.A. and Sweeny, J.G. (1983). The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts. *Tetrahedron*, **39**, 3005.

- 72 - Gao, L. and Mazza, G. (1994). Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by high performance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 118.
- 73 - Lee., S.H. and Hong V. (1992). Chromatographic analysis of anthocyanins *Journal of Chromatography*, **624**, 221
- 74 - Hong, V. and Wrolstad, E.R. (1990). Use of HPLC/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 708.
- 75 - Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W.W. (1963). Gaz-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem.Soc.*, **85**, 2497.
- 76 - Wood, V.K., Bonham, C., Hipskind, J. and Nicholson, L.R. (1994). Analysis of anthocyanins and 3-deoxyanthocyanidins by plasma desorption mass spectroscopy. *Phytochemistry*, **37**, 557.
- 77 - Hosokawa, K., Fukunaga, Y., Fukishi, E. and Kawabata, J. (1995). seven acylated anthocyanins in the blue flowers of *Hyacinthus orientalis*. *Phytochemistry* **38**, 1293.

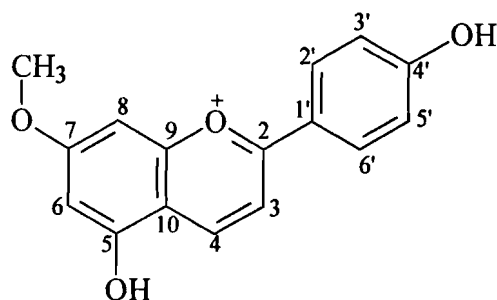
- 78 - Hosokawa, K., Fukunaga, Y., Fukishi, E. and Kawabata, J. (1995). Acylated anthocyanins from red *Hyacinthus orientalis*. *Phytochemistry* **39**, 1437.
- 79 - Takeda, K., Harborne, B.J. and Self, R. (1986). Identification of maloylated anthocyanins in the liliaceae and labiatae. *Phytochemistry*, **25**, 2191.
- 80 - Takeda, K., Harborne, B.J. and Self, R. (1986). Identification and distribution of malonylated anthocyanins in plants of the compositae. *Phytochemistry*, **25**, 1337.
- 81 - Saito, N., Timberlake, F.C., Tucknott, G.O. and Lewis, S.A. (1983). Fast atomic bombardement mass spectrometry of the anthocyanins violanin and platiconin. *Phytochemistry*, **22**, 1007.
- 82 - Palé, E., Kouda-Bonafos, M., Nacro, M., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R. (1999) Les anthocyanes dans quelques plantes africaines *Produits naturels d'origine végétale*, actes du 4^{ème} colloque d'Ottawa, du 26 au 29 mai 1998, CRDI (Canada), pp. 189-194.

ANNEXE I

DESCRIPTION DE QUELQUES ANTHOCYANES ISOLÉES

◆ 7-O-méthylapigénidine :

composé cristallisant sous forme de fines aiguilles brillantes jaune-orangées dans le méthanol ; UV-Visible λ_{\max} (nm) (MeOH-TFA, 0,01N) ($\log \epsilon$) 278 (4,52), 476 (4,82) ; IR (KBr) ν (cm^{-1}) 1634, 1590, 1530, 1380, 1333, 1230, 1175; ^1H RMN (250 & 600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-TFA}$ 0,4:0,1 ml) δ (ppm) 9,14 (1H, dd, j 0,8, 8,8, H-4), 8,33 (2H, dd, j 1,9, 7,1, H-2', H-6'), 8,09 (1H, d, j 8,8, H-3), 7,16 (1H, dd, j 0,8, 2,1, H-8), 7,10 (2H, dd, j 1,9, 7,1, H-3', H-5'), 6,75 (1H, d, j 2,1, H-6), 4,08 (3H, s, H-OMe) ; ^{13}C (MeOH-TFA, 0,4 : 0,1 ml) δ 173,9 (C-7), 172,8 (C-2), 168,2 (C-4'), 160,3 (C-5), 160,2 (C-9), 150,2 (C-4), 133,9 (C-2', C-6'), 122,5 (C-1'), 118,9 (C-3', C-5'), 114,1 (C-10), 111,8 (C-3), 103,1 (C-6), 94,3 (C-8), 58,0 (C-OMe) ; SIMS $[\text{M}]^+$ m/z 269.



♦ Cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)]-(6-*O*-*E*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**1**) :

composé amorphe de couleur rouille ; UV-Visible λ_{\max} nm (MeOH-TFA, 0,01N) ($\log \epsilon$) 283 (4,40), 295 (4,41), 329 (4,44), 530 (4,44) ; IR (KBr) ν 1685, 1630, 1605, 1340, 1280, 1195, 1070; ^1H RMN & ^{13}C (MeOH-TFA, 0,4 : 0,1 ml) voir Tableau 8, p. 83 (**1**) ; SM (ESI, mode positif, MeOH) $[\text{M}]^+$ m/z 1097.

♦ cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-coumaryl- β -*D*-glucopyranosyl)]-(6-*O*-*E*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**3**) :

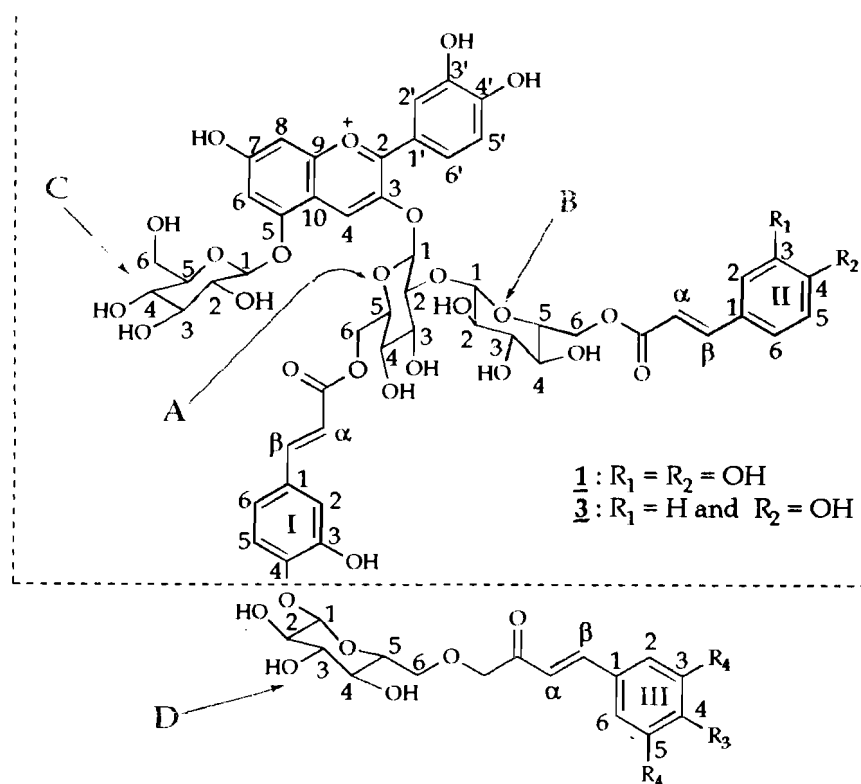
composé cristallisant sous forme de fines aiguilles rouilles brillantes dans le méthanol ; UV-Visible λ_{\max} (nm) (MeOH-TFA, 0,01N) ($\log \epsilon$) 283 (4,52), 295 (4,55), 319 (4,55), 528 (4,49) ; IR (KBr) ν (cm^{-1}) 1693, 1675, 1630, 1605, 1340, 1285, 1185, 1070 ; ^1H RMN & ^{13}C (MeOH-TFA, 0,4 : 0,1 ml) voir Tableau 8, p. 83 (**3**) ; SM (ESI, mode positif, MeOH) $[\text{M}]^+$ m/z 1081.

♦ Cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-*p*-caféyl- β -*D*-glucopyranosyl)]-{6-*O*-[4-*O*-(6-*O*-*E*-3,5-dihydroxycinnamyl)- β -*D*-glucopyranosyl]-*E*-caféyl]- β -*D*-glucopyranosyl}-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**5**) :

composé amorphe de couleur rouille ; UV-Visible λ_{\max} (nm) (MeOH-TFA, 0,01N) ($\log \epsilon$) 293 (4,57), 324 (4,52), 531 (4,41) ; IR (KBr) ν (cm^{-1}) 1693, 1685, 1630, 1603, 1340, 1285, 1190, 1070 ; ^1H RMN & ^{13}C (MeOH-TFA, 0,4 : 0,1 ml) voir Tableau 8, p. 83 (**5**) ; SM (ESI, mode positif, MeOH) $[\text{M}]^+$ m/z 1421.

◆ Cyanidine 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-coumaryl)- β -*D*-glucopyranosyl)]-{6-*O*-[4-*O*-(6-*O*-*E*-coumaryl)- β -*D*-glucopyranosyl]-*E*-caféyle]- β -*D*-glucopyranosyl}-5-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**8**) :

composé cristallisant sous forme de fines aiguilles rouilles brillantes dans le méthanol ; UV-Visible λ_{max} (nm) (MeOH-TFA, 0,01N) 295, 312, 532 ; IR (KBr) ν (cm⁻¹) 1690, 1675, 1640, 1603, 1280, 1180, 1075 ; ¹H RMN & ¹³C (MeOH-TFA, 0,4 : 0,1 ml) voir Tableau 8, p. 83 (**8**) ; SM (ESI, mode positif, MeOH) [M]⁺ m/z 1389.



Structures complètes des composés **1**, **3**, **5** et **8** isolés des fleurs de *Ipomoea asarifolia*

ANNEXE II ^[17]

Palé, E., Kouda-Bonafos, M., Nacro, M., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R. and Ottinger, R. (1997). 7-*O*-methylapigeninidin, an anthocyanidin from *Sorghum caudatum*. *Phytochemistry*, **45**, 1091.



Pergamon

Phytochemistry, Vol. 45, No. 5, pp. 1091–1092, 1997
 © 1997 Elsevier Science Ltd
 All rights reserved. Printed in Great Britain
 0031-9422/97 \$17.00 + 0.00

PII: S0031-9422(97)00099-X

7-O-METHYLAPIGENINIDIN, AN ANTHOCYANIDIN FROM *SORGHUM CAUDATUM*

ELOI PALE, MARIE KOUDA-BONAFOS, MOUHOSSINE NACRO, MAURICE VANHAELEN,*†
 RENÉE VANHAELEN-FASTRÉ† and ROBERT OTTINGER‡

Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Département de Chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Ouagadougou 03 BP7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso, †Laboratoire de Pharmacognosie et de Bromatologie, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus Plaine CP 205-4, Bld Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgium; ‡Département de Chimie Organique, Ecole Polytechnique, Université Libre de Bruxelles, CP 165, av. F.D. Roosevelt, 50, B-1050 Bruxelles, Belgium

(Received in revised form 14 December 1996)

Key Word Index—*Sorghum caudatum*; Poaceae; 7-O-methylapigeninidin; 3-deoxyanthocyanidins.

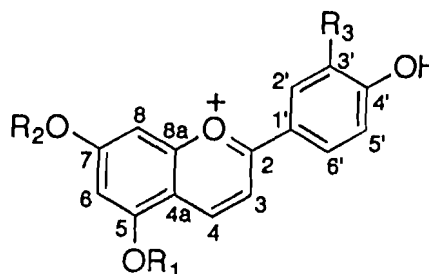
Abstract—A new anthocyanidin was isolated from the grains of *Sorghum caudatum* and identified as 7-O-methylapigeninidin on the basis of spectral data. This pigment was found in low concentration both in grains and in leaf sheaths. © 1997 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

INTRODUCTION

3-Deoxyanthocyanidins extracted from the grains of *Sorghum caudatum* [L.] Moench (Poaceae) are known for the yellow or orange coloration they show in acidic solutions. Previous studies on the grains and the leaf sheaths have shown the presence of apigeninidin and luteolinidin derivatives [1–5]. In order to complete the identification of the anthocyanin content, we describe here the isolation and the structure elucidation of a new *O*-methylated 3-deoxyanthocyanidin.

RESULTS AND DISCUSSION

Sorghum grains were extracted with ethanol under acidic conditions. The anthocyanins screening of the crude extract was achieved by HPLC with photodiode array detection; four anthocyanins 1–4 were detected on the basis of their UV-VIS spectra and relative retention times. The identity of the major constituent apigeninidin 3 was confirmed by co-elution with an authentic sample. Peaks 1 and 2 were tentatively attributed to the luteolinidin derivatives that were previously identified [1, 2]. The slowest pigment 4 was isolated from the crude extract as the TFA salt after chromatography successively on Sephadex LH-20 and on RP-18 silica gel. Its UV-VIS spectrum recorded in methanol with 0.1% HCl showed absorption maxima at 278.6 and 476.4 nm (Table 1), as observed for other



- 1 : $R_1 = \text{Glc}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$
 2 : $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$
 3 : $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$
 4 : $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{Me}$

3-deoxyanthocyanidins [6]; no aluminium-induced shift was observed. The SIMS showed a strong $[M]^+$ ion at m/z 269 consistent with the $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_4$ molecular formula. The ^1H and ^{13}C NMR spectral data (Table 2) were closely related to those of apigeninidin [7, 8], except for a singlet at 4.08 ppm due to an aromatic *O*-methyl group. The position of this group was unambiguously located at C-7 as DIFFNOEs were observed between the methyl protons and both the H-8 and H-6 protons. Moreover, the NOE enhancement of the H-8 signal was greater than that of the H-6 signal, suggesting that the methyl group was more oriented to H-8. 4 was therefore identified as 7-*O*-methylapigeninidin. It was not an artifact of the isolation method since it could be identified in the crude extracts

* Author to whom correspondence should be addressed.

Table 1. Chromatographic and spectral data of 4

TLC ($R_f \times 100$)*					UV-VIS spectrum §	
BAW	BuHCl	EFW	EAFW	AHW	λ_{max} (iv) nm (log ϵ)	λ_{max} (vis) nm (log ϵ)
76†		44†	77†		279	476
62†	45†			29†	(4.50)	(4.81)

* Solvent systems: BAW = 1-butanol-HOAc-H₂O (4:1:5) upper phase; BuHCl = 1-butanol-2 N HCl (1:1 upper phase); EFW = EtOAc-HCO₂H-2 N HCl (85:9:6); EAFW = EtOAc-HOAc-HCO₂H-H₂O (100:11:11:26); AHW = HOAc-HCl conc.-H₂O (15:3:82).

Adsorbents: † silica gel 60 (Merck) and ‡ microcrystalline cellulose F (Merck).

§ In MeOH with 0.1% HCl.

Table 2. ¹H and ¹³C NMR data of 4, in CD₃OD-TFA-*d*₁ (5:1)

	¹ H NMR δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	¹³ C NMR δ (ppm)
2		172.8
3	8.09, <i>d</i> (8.8)	111.8
4	9.14, <i>dd</i> (0.8, 8.8)	150.2
4 _a		114.1
5		160.3
6	6.75, <i>d</i> (2.1)	103.1
7		173.9
8	7.16, <i>d</i> (0.8, 2.1)	94.3
8 _a		160.2
1'		122.5
2' and 6'	8.33, <i>dd</i> (1.9, 7.1)	133.9
3' and 5'	7.10, <i>dd</i> (1.9, 7.1)	118.9
4'		168.2
-O-Me	4.08, <i>s</i>	58.0

prepared without methanol. The R_f value of 4 in standard TLC conditions are listed in Table 1; using these chromatographic conditions, low amounts of 4 were also detected in a crude extract of the leaf sheaths of the plant.

EXPERIMENTAL

Samples. grains and sheath leaves of *Sorghum caudatum* [L.] Moench (Poaceae), variety Monome Kaya, were collected in 1995 at the Experimental Station of INERA, Kamboinsé, Burkina Faso. A voucher specimen of the plant has been deposited at this

Station. The grains were harvested at post maturity and freeze-dried immediately after collection.

Spectrometric data. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at respectively 600 and 62.89 MHz with TMS as int. standard. SIMS were recorded on a autospec Micromass spectrometer (matrix: glycerol-HCl, 1:1)

Analytical HPLC. HPLC was carried out following the method described in ref. [9] with a Nova PakTM C₁₈ column (150 × 3.9 mm; 4 μm). The elution conditions were modified according to the polarity of the anthocyanins under investigation using a linear gradient solvent system from 30 to 60% of B (MeOH-H₂O-HCO₂H, 75:24.5:0.5) in A (H₂O-HCO₂H, 60:1) for 20 min; the final conditions of elution were kept isocratically for 10 min.

Anthocyanin isolation. 400 g of the freeze-dried grains were extracted twice by maceration with 500 ml of 1% TFA-EtOH for 48 hr at 5°. After filtration, the solution was concd to dryness under vacuum at 30°. The residue was then chromatographed on a Sephadex LH-20 column with MeOH-H₂O-TFA (30:70:0.3 then 35:65:0.3) as eluents. The frs containing 4 were pooled, concd and the final purification was achieved by chromatography on a RP-18 silica gel column with MeOH-H₂O-TFA (45:55:0.3) as eluent. The fr. containing the unknown anthocyanidin was concd and freeze-dried to yield 25 mg of 4.

Acknowledgements—This work was supported by a grant from the 'Fond Léopold Molle, Université Libre de Bruxelles, Belgium' and from the University of Ouagadougou, Burkina Faso.

REFERENCES

1. Nip, W. K. and Burns, E. E., *Cereal Chemistry*, 1969, 46, 490.
2. Nip, W. K. and Burns, E. E., *Cereal Chemistry* 1971, 48, 74.
3. Mazza, G. and Miniati, E., *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*, CRC Press, Tokyo, 1996, p. 234.
4. Sérémé, A., Kouda-Bonafos, M. and Nacro, M., *Biomass and Bioenergy*, 1993, 4, 69.
5. Kouda-Bonafos, M., Czyzewska, E., Nacro, M. and Oehlschlager, A. C., *Journal of Chemistry and Ecology*, 1994, 20, 2123.
6. Ribéreau-Gayon, P., *Les Composés Phénoliques des Végétaux*. Dunod, Paris, 1968, p. 143.
7. Nilson, E. *Chemica Scripta*, 1973, 4, 49.
8. Kouda-Bonafos, M., Nacro, M. and Ancian, B., *Magnetic Resonance Chemistry*, 1996, 34, 389.
9. Gao, L. and Mazza G., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42, 118.

ANNEXE III ^[16]

Palé, E., Nacro, M., Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastré, R. (1997)
Anthocyanins from Bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *J. Agric. Food
Chem.*, **45**, 3359.

ARTICLES

Anthocyanins from Bambara Groundnut (*Vigna subterranea*)Eloi Pale,[†] Mouhoussine Nacro,[†] Maurice Vanhaelen,^{*‡} and Renée Vanhaelen-Fastré[‡]

Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Département de Chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Ouagadougou 03, B.P. 7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso; and Laboratoire de Pharmacognosie et de Bromatologie, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus Plaine C.P. 205-4, Bld Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgium

Among five pigments detected in bambara groundnut (*Vigna subterranea*), three major anthocyanins were isolated by combined column chromatography on Amberlite XAD-7, Sephadex LH-20, and RP-18 silica gel and by preparative thin-layer chromatography on silica gel. They were identified as delphinidin 3-*O*- β -glucoside, petunidin 3-*O*- β -glucoside, and malvidin 3-*O*- β -glucoside on the basis of chromatographic data and UV-vis, ¹H-NMR, and mass spectrometry.

Keywords: *Vigna subterranea*; Fabaceae; delphinidin; petunidin; malvidin; glucoside; ¹H NMR

INTRODUCTION

The grains of *Vigna subterranea* [L.] Verdc. (Fabaceae) (Mabberley, 1987) are widely used as food in West Africa. Previous works on other *Vigna* species have led to the isolation of cyanidin, malvidin, and delphinidin glycosides (Mazza and Miniati, 1996). Delphinidin 3-glucoside was found in *V. mungo*, *V. radiata*, and *V. angularis*; cyanidin 3-glucoside was identified in *V. mungo* and *V. radiata*; delphinidin 3-glucoside was isolated from *V. angularis* and *V. radiata*; delphinidin 3-(*p*-coumaryl)glucoside was detected in *V. mungo* and *V. radiata*, while delphinidin 3,5-diglucoside was found only in *V. radiata*.

To complete the chemical investigation of the genus *Vigna* and to pursue our studies on the pigment content of several plants growing in Burkina Faso, we report here the identification of 3- β -*O*-monoglucosides of cyanidin, petunidin, and malvidin in *V. subterranea* grains.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Solvents. All were of analytical grade and obtained from Merck-Clevenot Corp., Darmstadt, Germany.

Sample Preparation. Extracts were obtained from grains of *V. subterranea* collected in 1995 in Burkina Faso, West Africa. The pigments were extracted twice by maceration of 600 g of the grains with 1% trifluoroacetic acid (TFA) in CH₃-OH at 5 °C for 48 h. The crude extract was concentrated to dryness under vacuum and dissolved in 10 mL of 0.5% TFA in H₂O. This solution was filtered and fixed on a nonionic polymeric adsorbent (Amberlite XAD-7, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) column (length 300 mm, i.d. 20 mm) which was prewashed with 0.5% TFA/H₂O; the pigments were then eluted with MeOH/H₂O/TFA, 70:30:0.3). The eluate was concentrated, filtered through a Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) column (length 300 mm, i.d. 20 mm), and further purified on a Lobar glass prepac column (Licroprep RP-8 column, 310 mm length, 25 mm i.d., Merck-

Clevenot Corp.) with MeOH/H₂O/TFA, 40:60:0.3. The final purification was achieved by preparative thin-layer chromatography (TLC) on silica gel 60 F₂₅₄ (Merck-Clevenot Corp.) using EtOAc/HCO₂H/HOAc/H₂O, 100:11:1 1:26 (EFAW), as solvent system. The isolated bands of adsorbent were eluted with 0.5% TFA/MeOH, and the solutions were concentrated and filtered through a RP-18 column using (0.5% TFA/H₂O)/MeOH (6:4). The eluates were finally concentrated and freeze-dried to give 1 (5 mg), 3 (10 mg), and 5 (4 mg) as TFA salts.

HPLC and GLC Conditions. High-performance liquid chromatography (HPLC) was carried out following the method described by Gao and Mazza (1994); the elution conditions were, however, modified according to the polarity of the pigments under investigation. The chromatographic system was equipped with two pumps (Model 6000 A), a solvent programmer (Model 660) from Waters Associates (Milford, MA), a diode array detector operating at 520 nm (Model 1040A from Hewlett-Packard, Germany), and a Nova Pak C₁₈ column (150 × 3.9 mm; mean particle size = 4 μ m); the elution was performed at 25 °C at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. A linear gradient solvent system was applied for 20 min from 20 to 60% of solvent B (MeOH/H₂O/HCO₂H, 75:24.5:0.5) in solvent A (H₂O/HCO₂H, 60:1); the final isocratic conditions for elution were maintained for 10 min. A photodiode array detector was used for the detection (520 nm) and the UV-vis spectra recording (from 250 to 600 nm).

Gas-liquid chromatography (GLC) identification of the sugar moieties was carried out by dissolving 2 mg of each anthocyanin in 4 mL of 2 N TFA/H₂O and heating in a sealed vial at 110 °C for 45 min. The anthocyanidins were extracted twice by 0.5 mL of 3-methyl-2-butanol (Ribéreau-Guyon, 1968). The resulting aqueous fractions were evaporated to dryness. The residue was taken for silylation in pyridine/*N*-(trimethylsilyl)imidazole (2:1) and heated in a sealed vial at 60 °C for 15 min. The silylated derivatives of sugar residues were identified by GLC on a fused silica capillary column coated with CP-Sil-8-CB (length 25 m, i.d. 0.32 mm, film thickness 0.25 μ m, Chrompack, Belgium) using cochromatography with sugar standards.

Spectroscopic Analysis. ¹H NMR spectral data were recorded on an instrument operating at 250 MHz (Model WM 250, Bruker, Karlsruhe, Germany) in CD₃OD/TFA-*d*₁ (0.5:0.1 mL) with TMS as internal standard. When the signals of the anomeric protons of the investigated anthocyanins were partially overlapped by the signal of the dissolved H₂O, an additional shift to lower magnetic field of this signal was produced by adding 30 μ L of TFA.

* Author to whom correspondence should be addressed [fax (02) 6505282; e-mail vanhaele@resulb.ulb.ac.be].

[†] Université de Ouagadougou.

[‡] Université Libre de Bruxelles.

Table 1. Chromatographic and UV-Vis Absorption Data of Anthocyanins 1, 3, and 5^a

anthocyanin	TLC ($R_f \times 100$)					HPLC (R_t in min)	UV-vis data (in 0.01 N HCl-MeOH)			
	BAW ^a	BuHCl ^a	1% HCl ^a	AHW ^a	EAFW ^b		UV λ , nm (log ϵ)	vis λ , nm (log ϵ)	+AlCl ₃ ^d (Δ in nm)	$E_{440}/E_{vis,max}$
1	19	06	05	10	34	14.40	279 (4.14)	541 (4.47)	+14	16
3	25	07	05	14	39	17.10	278 (4.22)	540 (4.55)	+9	16
5	32	11	08	23	44	19.10	278 (4.14)	539 (4.43)		18

^a Solvent systems: BAW, 1-butanol/acetic acid/water (4:1:5 upper phase); BuHCl, 1-butanol/2 N HCl (1:1 upper phase); 1% HCl, water/concentrated HCl (99:1); AHW, acetic acid/concentrated HCl/water (15:3:82); EAFW, ethyl acetate/acetic acid/formic acid/water (100:11:11:26). ^b Adsorbent: cellulose microcrystalline F. ^c Adsorbent: silica gel 60. ^d 2–3 drops of 5% AlCl₃ in MeOH were added.

Table 2. ¹H-NMR Spectral Data of Anthocyanins 1, 3, and 5 [δ in CD₃OD/TFA-*d*₁ (5:1)]

anthocyanin	1 δ (J in Hz)	3 δ (J in Hz)	5 δ (J in Hz)
aglycon	delphinidin	petunidin	malvidin
H-4	8.98 s	8.89 s	8.94 s
H-6	6.68 d (1.9)	6.57 d (1.9)	6.60 d (1.9)
H-8	6.88 d (1.3)	6.78 d (1.3)	6.83 d (1.3)
H-2'	7.78 s	7.82 d (2.1)	7.87 s
H-6'	7.78 s	7.69 d (2.1)	7.87 s
O-CH ₃		3.89 s	3.91 s
3-O- β -D-glucopyranose			
H-1''	5.32 d (7.6)	5.23 d (7.6)	5.25 d (7.6)
H-2'', H-3'', H-4'', and H-5''	3.51–3.81	3.26–3.68	3.30–3.71
H-6a''	3.96 dd (1.3, 10.4)	3.84 dd (1.2, 12.0)	3.84 dd (2.0, 12.0)
H-6b''	3.78 d (10.4)	3.66 d (12.0)	3.65 d (12.0)

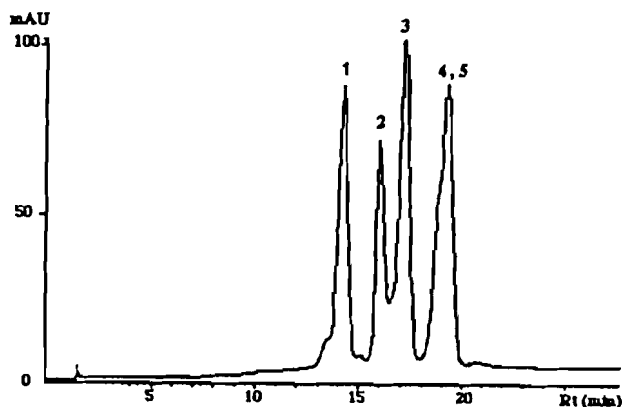


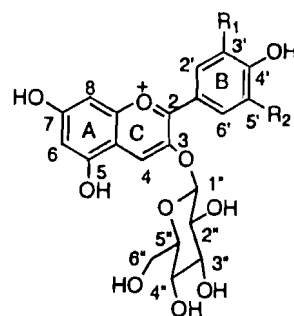
Figure 1. HPLC chromatogram of a crude methanol extract of grains of *V. subterranea* (conditions are given under Materials and Methods).

Liquid secondary ion mass spectrometry (SIMS) was carried out using a mass spectrometer (Model Autospec, Micromass, Manchester, England). The matrix was glycerol/HCl (1:1).

RESULTS AND DISCUSSION

V. subterranea grains were extracted by methanol with added TFA. A preliminary HPLC of the crude extract allowed the detection of five pigments (Figure 1) having UV-vis spectra typical of the anthocyanins. The crude methanol extract was chromatographed successively on an ion-exchange resin, on a Sephadex column, and on a reversed phase silica gel column to give three major pigments: 1 (relative proportion = 26%), 3 (relative proportion = 23%), and 5 (relative proportion = 36%). They were finally purified by preparative TLC on silica gel. R_f data observed in standard TLC conditions used for this group of pigments, retention times in HPLC, and absorption maxima in UV-vis spectra of 1, 3, and 5 are presented in Table 1.

Our attempts to isolate the minor pigments 2 (relative proportion = 8%) and 4 (relative proportion = 4%) were unsuccessful, and their identifications were therefore dropped from of the study. The complete separation of 4 from 5 was only possible by preparative TLC on silica



- 1 : $R_1 = R_2 = \text{OH}$
 3 : $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$
 5 : $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

gel. All isolated pigments were present in the crude methanol extract as confirmed by comparison of the HPLC profiles of a crude methanol extract prepared without TFA; a possible hydrolysis during the extraction steps in the presence of TFA was thus discarded.

The hydrolysis of 1, 3, and 5 in TFA solution afforded glucose as confirmed by GLC analysis after silylation. The SIMS of anthocyanins 1, 3, and 5 showed strong $[M]^+$ ions at, respectively, m/z 465, 479, and 493, consistent with $C_{21}H_{21}O_{12}$, $C_{22}H_{23}O_{12}$, and $C_{23}H_{25}O_{12}$ molecular formulas. In addition, ions observed at m/z 303 for 1, at m/z 317 for 3, and at m/z 331 for 5 were assigned to a loss of $[C_6H_{10}O_5]^+$, the glucosyl moiety, in accordance with the GLC results. The linkage of the glucosyl moiety at C-3 was deduced from the chemical shift of the anomeric protons (Table 2) and by the $E_{440}/E_{vis,max}$ values (Table 1) (Ribéreau-Gayon, 1968). The β configuration of the glucose moiety of all three anthocyanins was confirmed from the magnitude ($J = 7.6$ Hz) of the $J_{1'',2''}$ coupling constant in the ¹H NMR spectra (Table 2). The ¹H NMR data related to the aglycon protons were in close agreement with those reported for other delphinidin, petunidin, and malvidin 3-O- β -glucosides (Kim et al., 1989; Terahara et al., 1990; Tsuda et al., 1994). The complete data, which were partially reported until now, are listed in Table 2.

Compounds 1, 3, and 5 were, therefore, respectively, delphinidin 3-O- β -glucoside, petunidin 3-O- β -glucoside,

and malvidin 3-O- β -glucoside. The coloration of different grain samples showed marked variations; therefore, the pigment concentration was assumed to be dependent on the cultivation region and on the harvest time. The usual consumption of the *V. subterranea* grains in Burkina Faso provided a mean daily intake of 5–10 mg of the pigments. Because of the known biological activities of anthocyanins (Morazzoni and Bombardelli, 1996), health benefits due to significant consumption of this food have to be considered.

LITERATURE CITED

- Gao, L.; Mazza, G. Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by high performance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 118–125.
- Kim, H. J.; Nonaka, G. I.; Fujieda, K.; Uemoto, S. Anthocyanidin malonylglucosides in flowers of *Hibiscus syriacus*. *Phytochemistry* 1989, 28, 1503–1506.
- Mabberley, D. J. *The Plant-Book. A Portable Dictionary of the Higher Plants*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1987; p 607.
- Mazza, G.; Miniati, E. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*; CRC Press: Tokyo, 1996; pp 250–264.
- Morrazoni, P.; Bombardelli, E. *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia* 1996, 3–29.
- Ribéreau-Gayon, P. *Composés phénoliques des végétaux*; Dunod: Paris, 1968; pp 143–172.
- Terahara, N.; Saito, N.; Honda, T.; Toki, K.; Osajima, Y. Further structural elucidation of the anthocyanin, deacylternatin, from *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 1990, 29, 3686–3687.
- Tsuda, T.; Ohshima, K.; Kawakishi, S.; Osawa, T. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 248–251.
- CAS Registry No. (Supplied by the Author): delphinidin 3-O- β -glucoside, 6906-38-03; malvidin 3-O- β -glucoside, 7228-78-6; petunidin 3-O- β -glucoside, 6988-81-4.

Received for review November 25, 1996. Revised manuscript received June 20, 1997. Accepted June 26, 1997.* This work was supported by a grant from the Fond Léopold Molle, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

JF960897C

* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, August 1, 1997.

ANNEXE IV ^[12]

Palé, E., Nacro, M. and Kouda-Bonafos M.(1998) Anthocyanins from fruits of *Lanea microcarpa*. *Trop. Sci.*, **38**, 20.

Trop. Sci. 1998, 38, 20–24

Anthocyanins from fruits of *Lannea microcarpa*

E. Palé, M. Nacro and M. Kouda-Bonafos*

Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso. *To whom correspondence should be addressed

Abstract The major anthocyanin pigments from fruits of *Lannea microcarpa* were identified as cyanidin 3-O-(2-O- β -D-xylopyranosyl)- β -D-galactopyranoside (0.15%) and cyanidin 3-O- β -D-galactopyranoside (0.45%). The amount of total anthocyanins in the fruit was 1300 mg/100 g of dry epicarp.

Keywords: *Lannea microcarpa*, Anacardiaceae, anthocyanins, natural pigments.

Introduction

Lannea microcarpa (Anacardiaceae) is a wild tree 6–8 m high, indigenous to the Western African savannah. The fruits are ovoid drupes 7–8 mm long and edible. This study is part of a screening programme for plant pigments (Séréomé *et al.* 1993, 1995; Nacro and Millogo-Rasolodimby 1994; Kouda-Bonafos *et al.* 1994, 1996; Palé *et al.* 1997) that might be alternatives to synthetic dyes.

Materials and methods

Fresh mature fruits from *L. microcarpa* were harvested when dark purple in colour (May–July). The epicarp of the fruits was quickly washed with water, frozen, lyophilized and ground; the powder was stored in vacuum until extracted.

The epicarp powder (5 g) was extracted three times with 100 ml of 1% HCl in ethanol and the extract concentrated in vacuum. Descendent chromatography of the concentrate on Whatman 3MM paper using HAc-HCl as solvent gave two bands. Each was dissolved in 0.01N HCl/MeOH and purified again by descendent chromatography on Whatman 3MM paper using BAW (Francis 1982). Each band was again dissolved in 0.01N HCl/MeOH and vacuum concentrated. The pigments were then precipitated by addition of ethyl acetate, separated by centrifugation and dried, yielding 7.5 mg and 22.5 mg of pigment R₁ and R₂ respectively. The chromatographic solvents are specified in Table I.

The spectral data were obtained with a SAFAS double energy system, DES 190 spectrophotometer. The pigments were dissolved in 0.01N HCl/MeOH and the AlCl₃ shifts were determined by adding 2 or 3 drops of 5% AlCl₃/EtOH.

For total hydrolysis 4 ml of 2N trifluoroacetic acid was added to 2 mg of each pigment and the mixture was heated at 110°C for 45 min in vials. After cooling, the aglycones were

Accepted 7 February 1997

extracted using 3-methylbutan-2-ol, evaporated and spotted onto Whatman 3MM paper with standard solutions of aglycones. The paper was run in BAW and Forestal. The aqueous solution containing the sugars was vacuum evaporated to dryness. The residues were taken for derivatization in pyridine/*N*-(trimethylsilyl)imidazol (2:1) and heated at 60°C for 15 min. The TMSSi derivatives were identified by GC on a CP-Sil-8-CB Chromapack column in comparison with authentic sugar standards.

Table 1. Chromatographic solvents

Abbreviation	Composition	Proportion (v/v)
BAW	n-Butanol:glacial acetic acid:water. Upper phase	4:1:5
BuHCl	n-Butanol:2N hydrochloric acid. Upper phase	1:1
1% HCl	Concentrated hydrochloric acid:water	3:97
15% HAc	Glacial acetic acid:water	15:85
HAc-HCl	Water:glacial acetic acid:concentrated hydrochloric acid	82:15:3
Forestal	Glacial acetic acid:concentrated hydrochloric acid:water	30:3:10

For controlled hydrolysis, 5 mg pigment were dissolved in 2 ml of 0.01N HCl/MeOH, 2 ml of 2N HCl was added, and the solution was boiled in a water bath. The solution was sampled at intervals (0–30 min), each sample being spotted onto Whatman 3MM paper and developed in BAW and HAc-HCl. The total anthocyanin content of fruit epicarp was determined by comparing the absorbance at 529 nm of the crude extract with standard solutions of pure anthocyanins extracted from *L. microcarpa* using 0.01N HCl/MeOH as solvent. Appropriate adjustments were made for dilution. The crude extract used for the determination of the total anthocyanin content was prepared by extraction of lipids from the lyophilized fruit epicarp. The lipid-free residue was dissolved in methanol and precipitated with ethyl acetate.

¹H NMR (250 MHz) spectral data were obtained on a Bruker spectrometer in CD₃OD-TFA-*d*₁ (0.5:0.1 ml). A shift to lower magnetic field of dissolved H₂O signal was produced by adding 30 µl of TFA-*d*₁.

Results and discussion

The most efficient purification and separation were obtained using HAc, HCl and HAc-HCl as elution solvents (Table 2). The two pigments R₁ and R₂ showed, respectively, one peak at 281 and 282 nm, characteristic of non-acylated anthocyanins (Figure 1 and Table 3). The addition of AlCl₃ showed a bathochromic effect in the visible spectra for the two pigments (Table 3), indicating the presence of free vicinal hydroxyl groups in the B ring (Pomilio 1973; Ribéreau-Gayon 1968; Iaderoza *et al.* 1992). Moreover, no pigment showed fluorescence under UV light, indicating no substitution at the 5-position. These data were confirmed by the $\Lambda_{410}/\Lambda_{\text{vis,max}}$ ratio, which remained constant after hydrolysis (Table 3). Acid hydrolysis of the pigments yielded the same aglycone, identified as cyanidin by chromatography, UV/visible and ¹H NMR, and by comparison with an authentic sample

and with the literature data (Tables 2 and 3). Controlled hydrolysis of R_1 showed one intermediate pigment (R_{1a}) similar to R_2 (Table 2). Similar hydrolysis of R_2 showed no intermediate pigment, indicating the presence of only one sugar, identified as galactose (Tables 2 and 4). Total hydrolysis of R_1 yielded two sugars identified as galactose and xylose. The ^1H NMR data (Table 4) confirmed the identification of β -D-glycopyranosyl configuration of the two sugar moieties, because of the large coupling constants of their anomeric proton ($J_{\text{H1-H2}} \sim 7.5\text{--}7.7$ Hz). Moreover, the shift to lower magnetic field of H-2 signals of the galactosyl ($\Delta\delta_{\text{H2}(R_1-R_2)} \sim 0.3$ ppm) indicated that this position was glycosylated (Nakatani *et al.* 1995; Terahara *et al.* 1996). Thus R_1 and R_2 are identified as cyanidin 3-O-(2-O- β -D-xylopyranosyl)- β -D-galactopyranoside and cyanidin 3-O- β -D-galactopyranoside, respectively. As the total amount of anthocyanin in the fruit was 1300 mg/100 g of dried epicarp, the fruits of *Lansea microcarpa* are a promising source of natural pigments.

Table 2. Chromatographic data of pigments from *L. microcarpa* fruits

	$R_f \times 100$						$R_f(\text{min})^*$		
	HAc 15%	HAc-HCl	1% HCl	BAW	Bu-HCl	Forestal	α	β	ΔR_f
R_1	80	61	43	45	48	75			
R_{1a}^{**}	-	40	-	44	-	-			
R_{1b}^{**}	-	11	-	71	-	-			
R_2	76	40	14	43	46	60			
R_{2a}^{**}	-	10	-	72	-	-			
Aglycone from									
R_1 and R_2	-	-	-	71	-	50			
Cyanidin	-	-	-	72(71)	-	52(48)			
Malvidin	-	-	-	65	-	53(60)			
Sugars from:									
R_1	-	-	-	-	-	-	14.60	15.90	1.30
	-	-	-	-	-	-	18.20	19.20	1.00
R_2	-	-	-	-	-	-	18.30	19.30	1.00
Glucose							19.30	20.90	1.30
Galactose							18.30	19.30	1.00
Xylose							14.70	16.00	1.30

Values in parentheses were reported by Iaderoza *et al.* (1992) and Ribéreau-Gayon (1968).

* GC analysis of silylated sugars.

** R_{1a} , R_{1b} and R_{2a} are the products of controlled hydrolysis from R_1 and R_2 respectively.

Anthocyanins from *Lanea microcarpa*

23

Table 3. UV/Vis spectral data of anthocyanins from *L. microcarpa* fruits in 0.01N HCl/MeOH

	Pigments		Aglycones	Standards	
	R ₁	R ₂	A (R ₁ and R ₂)	Cyanidin	Malvidin
$\lambda_{\text{max. uv}}$ (nm)	281	282	277	278	275
$\lambda_{\text{max. visible}}$ (nm)	529	529	539	538(545*; 545**)	547
$A_{\text{uv. max}}/A_{\text{vis. max}}$	70	76	60	54	47
$A_{440}/A_{\text{vis. max}}$	22	20	21	19	15
UV fluorescence	no	no	no	no	no
Change in $\lambda_{\text{vis. max}}$ with AlCl ₃ addition (nm)	+35	+36	+8	+8	00

*Data obtained in 0.01N HCl/EtOH.

**Data reported by Ribéreau-Gayon (1968).

Table 4. ¹H NMR spectral data of anthocyanins from *L. microcarpa* fruits

Assignment	R ₁ δ (ppm)(Hz)	R ₂ δ (ppm)(Hz)
Aglycone		
H-4	8.99, s	8.88, s
H-6	6.91, d (1.3)	6.78, d (1.3)
H-8	6.70, d (1.9)	6.60, d (1.9)
H-2'	8.10, d (2.3)	7.72, d (2.3)
H-5'	7.05, d (8.7)	6.89, d (8.7)
H-6'	8.26, dd (8.7, 2.3)	8.09, dd (8.7, 2.3)
β-D-Glucopyranosyl		
H-1	5.42, d (7.6)	5.26, d (7.7)
H-2	4.27, dd (9.3, 7.6)	4.00, d (9.3, 7.7)
H-3	3.5-4.0, m	3.4-4.0 m
H-4	3.5-4.0, m	3.5-4.0, m
H-5	3.5-4.0, m	3.5-4.0, m
H-6a	3.5-4.0, m	3.5-4.0, m
H-6b	3.5-4.0, m	3.5-4.0, m
β-D-Xylopyranosyl		
H-1	4.73, d (7.5)	
H-2	3.0-4.0, m	
H-3	3.0-4.0, m	
H-4	3.0-4.0, m	
H-5a	3.0-4.0, m	
H-5b	3.0-4.0, m	

Acknowledgement

We thank the IDRC, Canada, the Free University of Brussels and the University of Ouagadougou for financial support, and Dr Tiga Rigobert, YAMÉOGO, Ouagadougou, for providing authentic samples of sugars and for fruitful discussions.

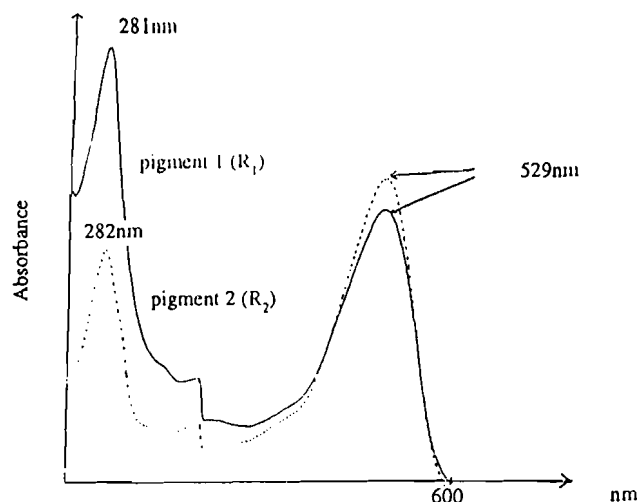


Figure 1. UV/Visible spectra of *L. microcarpa* pigments in 0.01N HCl/MeOH.

References

- Francis F.J. (1982) Analysis of anthocyanins. In: Anthocyanins as food colorants (Markakis P., ed.), pp. 181–207. New York: Academic Press.
- Iaderoza M., Baldini V.L.S., I dos Santos Draetta and Bovi M.L.A. (1992) Anthocyanins from fruits of açai (*Euterpe oleracea*, Mart) and juçara (*Euterpe eludi*, Mart). *Tropical Science* 32, 41–46.
- Kouda-Bonafos M., Czyzewska E., Nacro M. and Ochslager A.C. (1994) Isolation of apigeninidin from leaf sheaths of *Sorghum caudatum*. *Journal of Chemical Ecology* 20, 2123–2125.
- Kouda-Bonafos M., Nacro M. and Ancian B. (1996) Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts of a natural anthocyanidin, apigeninidin, using two dimensional COLOC and HMBC Techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry* 34, 389–392.
- Nacro M. and Millogo-Rasolodimby J. (1994) Plantes tinctoriales et plantes à tannins du Burkina Faso. Amiens: Scientifika.
- Nakatani N., Kikozaki H., Ohba M., Inami O. and Tamura I. (1995) Acylated anthocyanins from fruits of *Sambucus canadensis*. *Phytochemistry* 38, 755–757.
- Palé E., Kouda-Bonafos M., Nacro M., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R. and Ottinger R. (1997). 7-O-méthyl-apigeninidin, an anthocyanidin from *Sorghum caudatum*. *Phytochemistry* 45, 1091–1092.
- Pomilio A.B. (1973) Anthocyanins in fruits of *Berberis bruxifolia*. *Phytochemistry* 12, 218–220.
- Ribereau-Gayon P. (1968) Les composés phénoliques des végétaux, pp. 142–172. Paris: Dunod.
- Serémé A., Kouda-Bonafos M. and Nacro M. (1993) Phenolic compounds in *Sorghum caudatum* tissues during plant development. *Biomass and Bioenergy* 4, 69–71.
- Serémé A., Millogo-Rasolodimby J., Kouda-Bonafos M., Guinko S. and Nacro M. (1995) Teneur en tanins des organes de quatre espèces de la famille des Anacardiaceae. *Etudes sur la flore et la végétation du Burkina Faso* 2, 43–45.
- Terahara N., Callebaut A., Ohba R., Nagata T., Ohnishi-Kameyama M. and Suzuki M. (1996) Triacylated anthocyanins from *Ajuga reptans* flowers and cell cultures. *Phytochemistry* 42, 199–203.

ANNEXE V [52]

Palé, E., Nacro, M., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R. and Ottinger, R.
(1998) Acylated anthocyanins from the flowers of *Ipomoea asarifolia*.
Phytochemistry, **48**, 1433.



Pergamon

Phytochemistry, Vol. 43, No. 1, pp. 133–141, 1998
 © 1998 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
 Printed in Great Britain
 0031-9422/98/\$ - see front matter

PII: S0031-9422(97)00805-4

ACYLATED ANTHOCYANINS FROM THE FLOWERS OF *IPOMOEA ASARIFOLIA*

ELOI PALE, MOUHOUSSE NACRO, MAURICE VANHAELEN,*† RENÉE VANHAELEN-FASTRÉ‡ and ROBERT OTTINGER‡

Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Département de Chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Ouagadougou 03 BP7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso; † Laboratoire de Pharmacognosie et de Bromatologie, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus Plaine CP 205-4, Bld Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgium; ‡ Département de Chimie Organique, Ecole Polytechnique, Université Libre de Bruxelles, CP 165 av. F. D. Roosevelt, 50, B-1050 Brussels, Belgium

(Received in revised form 4 August 1997)

Key Word Index— *Ipomoea asarifolia*; Convolvulaceae; acylated anthocyanins; cyanidin; *p*-coumaric acid; caffeic acid.

Abstract— Among several anthocyanins detected in the flowers of *Ipomoea asarifolia*, two acylated anthocyanins were isolated and studied using chemical, GC, mass spectrometric and extensive NMR methods (TOCSY-1D, DQF-COSY and HMBC measurements). The first anthocyanin was identified as cyanidin 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-(*E*-caffeoyl)- β -D-glucopyranosyl)-6-*O*-(*E*-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside]-5-*O*-[β -D-glucopyranoside], and the new structure as cyanidin 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-(*E*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl)-6-*O*-(*E*-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside]-5-*O*-[β -D-glucopyranoside]. © 1998 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

INTRODUCTION

Ipomoea asarifolia [Desv.] Roem. and Schult. (Convolvulaceae) [1] is a tropical creeping plant in permanent flowering growing in West Africa. It is very abundant in area around rivers. To pursue our studies on the pigment of several plants growing in Burkina Faso and in connection with the increasing need of natural dyes, we investigated the anthocyanins content of the flowers. Previous works achieved on the tuber of *I. batatas* (sweet potato) [2–4] and on the flowers of *I. carnea* [5, 6] have led to the isolation of acylated anthocyanins based on cyanidin. Particularly, two partly characterized diacylated anthocyanins, cyanidin 3-*O*-(dicaffeoyl-sophoroside)-5-*O*-glucoside and cyanidin 3-*O*-(coumaroylcaffeoyl-sophoroside)-5-*O*-glucoside were isolated [5]. In addition, several acetylated pelargonidin glycosides and acylated cyanidin glycosides were more recently isolated from the flowers of *I. purpurea* [7, 8]. The present paper describes the structure elucidation of two major anthocyanins isolated from the flowers of *I. asarifolia*; one of them is new.

RESULTS AND DISCUSSION

The flower petals, freshly collected and freeze-dried, were ground and extracted by MeOH in acidic con-

ditions. Anthocyanins screening in the crude extract was carried out by HPLC following the method described by Gao and Mazza [9]. The elution conditions were however modified according to the polarity of the pigments under investigation. Among eight pigments, the major anthocyanins 1 ($R_f = 13.21$ min) and 3 ($R_f = 14.96$ min) showing absorption at about 530 nm were selected for further purification and structure elucidation (Fig. 1). Successive CC on Amberlite XAD-7, LH-20, and RP-8 silica gel and prep. TLC allowed their isolation as TFA salts.

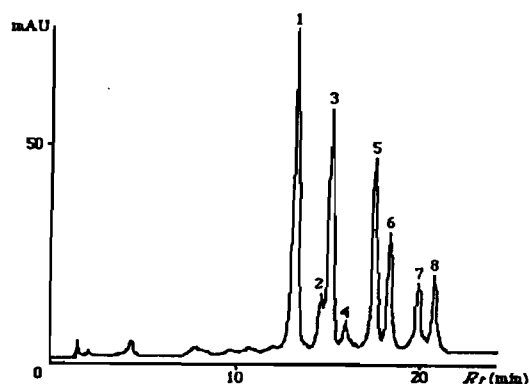
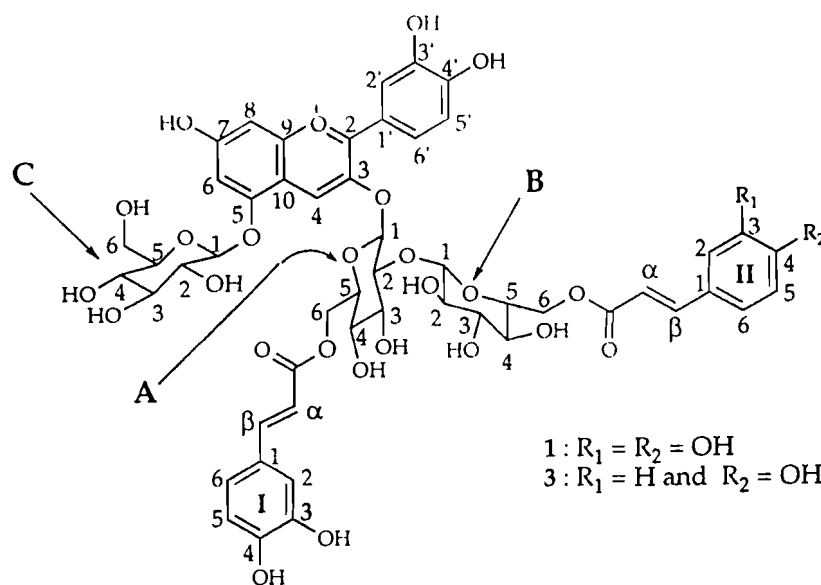


Fig. 1. HPLC chromatogram of a methanol crude extract of *I. asarifolia* flowers.

* Author to whom correspondence should be addressed.



Pigment **1** was identified as 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-(*E*-caffeoyl)- β -*D*-glucopyranosyl)-6-*O*-(*E*-caffeoyl)- β -*D*-glucopyranoside]-5-*O*-[β -*D*-glucopyranoside] by direct comparison of its UV (Table 1), with those earlier published for the identical pigment isolated from *I. purpurea* [8].

As observed for **1**, the UV-visible spectrum of **3** showed two characteristic absorptions at 295 and 319 nm corresponding to phenolic acid residues in addition to the absorption at 528 nm (Table 1). The $E_{\text{acyl}}/E_{\text{vis}}$ ratio (Table 1) indicated the presence of two phenolic acid moieties. The E_{440}/E_{vis} ratio (Table 1) compared to that of cyanidin suggested that the C-5 was substituted [10]; the bathochromic shift on the maximum visible wavelength, obtained by addition of AlCl_3 , indicated the presence of vicinal free hydroxyl groups in the anthocyanidin. On acidic hydrolysis, **3** afforded only glucose that was identified by GC as the TMSSi ether. The TLC analysis of the products obtained by alkaline hydrolysis allowed the identification of caffeic and *p*-coumaric acids. This result indicated that at least one molecule of each of these

acids esterified a glucosyl moiety and was not included in the chain [11]. The ESI MS showed a molecular ion at 1081 (100%) [M^+] consistent with $\text{C}_{51}\text{H}_{53}\text{O}_{26}$ molecular formula. 919 [M -caffeoyl] $^+$, 773 [M -(coumaroyl-caffeoyl) or -(coumaroyl-glucosyl)] $^+$, 611 [M -coumaroyl-caffeoyl-glucosyl] $^+$, [M-coumaroyl-caffeoyl-(glucosyl) \times 2] $^+$, 287 [M-coumaroyl-caffeoyl-(glucosyl) \times 3] $^+$. In the ^1H NMR spectra, the ring protons signals of cyanidin appeared at δ 8.85 (H-4), 8.22 (H-6'), 7.92 (H-2'), 7.00 (H-5'), 6.86 (H-6) and 6.84 (H-8). Two pairs of doublet signals at δ (5.96 and 7.20) and δ (5.81 and 7.10) with large coupling constants ($J = 16$ Hz) were observed, indicating the *E*-configuration of the olefinic protons of the two phenolic acid residues, caffeic and coumaric acids. Most of the sugars protons appeared between δ 3.0-5.5 as overlapping signals. However, the three characteristic doublets corresponding to the anomeric protons of Glc A, B and C were clearly sep'd at respectively δ 5.32, 4.79, and 5.12. Their β -*D*-pyranoside configurations were confirmed by their large coupling constants ($J = 7.2$ -8.4

Table 1. Chromatographic and UV-vis data of the anthocyanins **1** and **3** from *Ipomoea asarifolia* flowers

Anthocyanin	TLC ($R_f \times 100$)		HPLC R_f (min)	UV-vis				
	BAW*	EAF-W†		λ_{max} (nm) (log ϵ)	$E_{\text{acyl}}/E_{\text{vis max}}$	$E_{440}/E_{\text{vis max}}$	+ AlCl_3 ‡ Δ (nm)	
1	24	35	13.21	283 (4.19), 330 (4.44)	296 (4.41), 528 (4.44)	0.95	12	+12
3	30	43	14.96	283 (4.51), 319 (4.54)	295 (4.54), 528 (4.48)	1.10	12	+11

Adsorbents: * microcrystalline cellulose F and † silica gel 60 (Merck). For HPLC and TLC conditions: see Experimental. ‡ 2-3 drops 5% AlCl_3 in MeOH were added.

Acylated anthocyanins from *Ipomoea asarifolia*

1435

Table 2. ^{13}C and ^1H NMR spectral data for anthocyanins 1 and 3 from *Ipomoea asarifolia* in $(\text{CD}_3\text{OD}-\text{TFA}-d_4(5:1))^*$

Assignment	1		3		
	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)	
Aglycone	2	165.0		164.8	
	3		145.0	145.0	
	4	8.4, <i>s</i>	138.7	8.85, <i>s</i>	139.0
	5		156.9		156.7
	6	6.85, <i>d</i> (1.8)	105.6	6.86, <i>d</i> (1.8)	105.6
	7		170.0		170.0
	8	6.83, <i>d</i> (1.8)	97.6	6.84, <i>d</i> (1.8)	97.6
	9		156.6		157.1
	10		113.0		113.0
	1'		120.0		120.7
	2'	7.92, <i>d</i> (1.8)	118.6	7.92, <i>d</i> (1.8)	118.5
	3'		147.3		147.4
	4'		156.3		156.4
	5'	7.00, <i>d</i> (8.4)	117.5	7.00, <i>d</i> (8.4)	117.5
6'	8.19, <i>dd</i> (8.4, 1.8)	129.1	8.22, <i>dd</i> (8.4, 1.8)	129.2	
Glucose A	1	5.36, <i>d</i> (7.4)	102.9	5.32, <i>d</i> (7.2)	102.9
	2	4.00, <i>dd</i> (7.4, 9.0)	83.7	3.98, <i>dd</i> (7.2, 9.0)	83.9
	3	3.81, <i>t</i> (9.0)	76.0	3.78, <i>t</i> (9.0)	75.9
	4	3.60, <i>dd</i> (9.0, 9.6)	71.1	3.59, <i>dd</i> (9.0, 9.6)	71.2
	5	6.76, <i>m</i> (9.6, 5.5)	77.7	3.74, <i>m</i> (9.6, 5.4)	77.7
	6a	4.45, <i>d</i> (5.5, 12)	64.1	4.43, <i>dd</i> (5.4, 12.0)	64.1
	6b	4.11, <i>d</i> (4.4)	64.1	4.10, <i>d</i> (12.0)	64.1
Glucose B	1	4.81, <i>d</i> (7.0)	106.0	4.79, <i>d</i> (8.4)	106.1
	2	3.52, <i>dd</i> (7.0, 9.0)	75.3	3.50, <i>dd</i> (8.4, 9.6)	75.4
	3	3.50, <i>dd</i> (9.0, 6.8)	77.3	3.44, <i>dd</i> (9.6, 7.2)	77.4
	4	3.46, <i>dd</i> (6.8, 6.0)	71.2	3.46, <i>dd</i> (7.2, 6.6)	71.1
	5	3.48, <i>dd</i> (6.0, 2.4)	78.6	3.52, <i>dd</i> (6.6, 3.4)	78.7
	6	4.32, <i>dd</i> (2.4, 12.0)	63.9	4.24, <i>dd</i> (3.4, 12.0)	64.0
		63.9	4.24, <i>d</i> (12.0)	64.0	
Glucose C	1	5.16, <i>d</i> (7.6)	102.4	5.12, <i>d</i> (7.8)	106.2
	2	3.80, <i>dd</i> (7.6, 9.0)	74.5	3.76, <i>dd</i> (7.8, 9.0)	75.5
	3	3.65, <i>t</i> (9.0)	76.0	3.61, <i>t</i> (9.0)	76.4
	4	3.53, <i>dd</i> (9.0, 9.6)	71.4	3.50, <i>dd</i> (9.0, 9.6)	71.4
	5	3.70, <i>m</i> (9.6, 2.4)	77.8	3.57, <i>m</i> (9.6, 2.4)	77.8
	6a	3.73, <i>dd</i> (2.4, 12.0)	62.4	3.79, <i>dd</i> (2.4, 12.0)	62.5
	6b	4.02, <i>d</i> (12.0)	62.4	4.03, <i>d</i> (12.0)	62.5
Acyl I		<i>E</i> -Caffeoyl		<i>E</i> -Caffeoyl	
	1		127.3		127.3
	2	6.82, <i>d</i> (1.8)	115.2	6.63, <i>d</i> (1.8)	115.2
	3		146.4		146.4
	4		149.5		149.6
	5	6.72, <i>d</i> (8.4)	116.5	6.75, <i>d</i> (8.4)	116.5
	6	6.64, <i>dd</i> (8.4, 1.8)	123.4	6.68, <i>dd</i> (1.8, 8.4)	123.3
	α	5.94, <i>d</i> (16.0)	114.4	5.96, <i>d</i> (16.0)	114.4
	β	7.18, <i>d</i> (16.0)	147.1	7.20, <i>d</i> (16.0)	147.1
	C=O		169.0		169.0
Acyl II		<i>E</i> -Caffeoyl		<i>E</i> -Coumaroyl	
	1		127.0		126.4
	2	6.60, <i>d</i> (1.8.0)	115.0	7.03, <i>d</i> (8.4)	130.9
	3		146.4	6.67, <i>d</i> (8.4)	116.8
	4		149.3		161.0
	5	6.61, <i>d</i> (8.4)	116.3	6.67, <i>d</i> (8.4)	116.8
	6	6.50, <i>dd</i> (8.4, 1.8)	122.8	7.03, <i>d</i> (8.4)	130.9
	α	5.75, <i>d</i> (16.0)	114.3	5.81, <i>d</i> (16.0)	114.3
	β	7.00, <i>d</i> (16.0)	146.6	7.10, <i>d</i> (16.0)	146.3
	C=O		168.6		168.7

* Assignments determined by COSY, HMBC, and TOCSY 1D.

Hz). ^1H NMR, ^{13}C NMR, TOCSY 1D spectra, DIFFNOE and HMBC experiments (Table 2) confirmed that the structural features of 3 were identical to those of 1 except for caffeic acid (acyl II) which was replaced by coumaric acid. This modification was confirmed by the ^{13}C NMR spectra which showed clearly signals at δ 130.9 and 116.8 with double intensities corresponding to (C-2, C-6) and (C-3, C-5) of *p*-coumaric acid. Finally, pigment 3 was identified as cyanidin 3-*O*-[2-*O*-(6-(*E*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl)-6-*O*-(*E*-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside]-5-*O*-[β -D-glucopyranoside].

EXPERIMENTAL

General procedures

TLC was carried out on plates of microcrystalline cellulose F (Merck) and silica gel (Merck) using three mobile phases: EAFW (EtOAc-HOAc-HCO₂H-H₂O, 100:11:11:26) and BAW (1-BuOH-HOAc-H₂O, 4:1:5 upper phase) for anthocyanins and toluene-HOAc-H₂O (40:10:5) for the phenolic acids. These latest were detected under UV light. HPLC was performed on a Waters Associates apparatus using a Nova Pak C₁₈ column (160 × 4 mm, 4 μm) at 25° with a flow rate of 0.8 ml min⁻¹ and monitoring with a photo diode array detector operating at 520 nm. A linear gradient solvent system was applied for 20 min from 40 to 75% of B (MeOH H₂O HCO₂H, 75:24.5:0.5) in A (H₂O-HCO₂H, 60:1); an isocratic elution was then maintained for 10 min. UV-vis spectra were recorded on a UV-265 FS spectrophotometer (Shimadzu) in 0.01 N HCl-MeOH (from 250 to 600 nm). Mass spectra were measured in MeOH with an electrospray LC-mass spectrometer (ESI) from Micromass. ^{13}C NMR (150 MHz) and ^1H NMR (600 MHz) spectral data were obtained on a Varian spectrometer in CD₃OD-TFA-*d*₁ (0.5:0.1 ml). When the signals of the anomeric protons of the investigated anthocyanins were partially overlapped by the signal of the dissolved H₂O, an additional shift to lower magnetic field of this signal was produced by adding 30 μl of TFA-*d*₁.

Plant material

The flowers of *Ipomoea asarifolia* [Desv.] Roem. and Schult. (Convolvulaceae) [1] were freshly harvested in August 1995 in the station of the University of Ouagadougou where a voucher specimen has been deposited. They were immediately freeze-dried and ground; they were stored in the dark and kept in a dry place.

Extraction and isolation of anthocyanins

10 g of sample were extracted with 200 ml of 1% TFA-MeOH at 5° overnight. The filtration residue was washed with 100 ml of solvent. The filtrates were

pooled and coned under vacuum to dryness under 35°. 10 ml of (0.5% TFA-H₂O)/MeOH (7:3) was added. The soln was filtered and coned to 5 ml. The mixt. was transferred on an Amberlite XAD-7 column that was first washed with 0.5% TFA-H₂O. Anthocyanins were eluted with (0.5% TFA-H₂O)/MeOH (3:7). The resulting soln was coned and subjected to a Sephadex LH-20 CC using [(0.5% TFA-H₂O)-MeOH, 7:3]. Each fr. was fractionated twice on a LiChroPrep RP-8 (440-37, 40-60 μm , Merck) column using (0.5% TFA-H₂O)/MeOH (6:4) at a flow rate of 3 ml min⁻¹. Fractions (about 10 ml) were collected and controlled by TLC on a silica gel with EAFW as solvent (Table 1). The major frs were coned and the purification was achieved by prep. TLC using EAFW as mobile phase. The isolated bands were eluted with 0.5% TFA-MeOH, coned and rechromatographed on a RP-18 silica gel using (0.5% TFA-H₂O)/MeOH (6:4). The eluates were coned and freeze-dried to give 1, 3 and 5 as TFA salts.

Hydrolysis procedures and identification of the acyl and the sugar moieties

Alkaline hydrolysis was performed under nitrogen according to the method described by Terahara *et al.* [12]. Prep. TLC on silica gel was carried out to purify the acyl moieties before the final identification by TLC in comparison with standards. Acidic hydrolysis were performed by dissolving 2 mg of each pigment in 4 ml of 2 N TFA-H₂O in a sealed vial and heating at 110° for 45 min. The anthocyanidins were extracted twice by 0.5 ml of 3-methyl-2-butanol. The resulting aq. frs were evaporated to dryness. The residues were taken for derivatization in pyridine/N-(trimethylsilyl)imidazole (2:1) and heated at 60° for 15 min. The TMSSi of sugar residues were identified by GC on a CP-Sil-8-CB Chromapack column (25 m × 0.32 mm I.D.) in comparison with authentic sugar standards.

Anthocyanin 1. 1097 [M - caffeoyl]⁺ (35), 773 [M - (caffeoyl) × 2 or caffeoylglycosyl]⁺ (1), 611 [M - (caffeoyl) × 2 - glucosyl]⁺ (3), 449 [M - (caffeoylglycosyl) × 2]⁺ (25), 287 [M - (caffeoyl) × 2 - (glucosyl) × 3]⁺ (54).

Anthocyanin 3. 1081 [M⁺] (100), 919 [M - caffeoyl]⁺ (41), 773 [M - (coumaroyl-caffeoyl) or - (coumaroyl-glucosyl)]⁺ (1), 611 [M - coumaroyl - caffeoyl - glucosyl]⁺ (3), 449 [M - coumaroyl - caffeoyl - (glucosyl) × 2]⁺ (37), 287 [M - coumaroyl - caffeoyl - (glucosyl) × 3]⁺ (52).

Acknowledgements -- This work was supported by a grant from the Fond Léopold Molle, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

REFERENCES

1. Nacro, M. and Millogo-Rasolodimbi, J., *Plantes Tinctoriales et Plantes à Tanins du Burkina Faso*, Scientifika, Amiens, 1993, p. 86.

2. Mazza, G. and Miniati, E., *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*, CRC Press, Tokyo, 1996, pp. 265-275.
3. Odake, K., Terahara, N., Saito, N., Toki, K. and Honda, T., *Phytochemistry*, 1992, **31**, 2127.
4. Goda, Y., Shimizu, T., Kato, Y., Nakamura, M., Maitani, T., Yamada, T., Terahara, N. and Yamaguchi, M., *Phytochemistry*, 1997, **44**, 183.
5. Pomilo, A. B. and Sproviero, J. F., *Phytochemistry*, 1972, **11**, 1125.
6. Pomilo, A. B. and Sproviero, J. F., *Phytochemistry*, 1972, **11**, 2323.
7. Saito, N., Tatsuzawa, F., Yokoi, M., Kasahara, K., Ida, S., Shigihara, A. and Honda, T., *Phytochemistry*, 1996, **43**, 1365.
8. Saito, N., Tatsuzawa, F., Yoda, K., Yokoi, M., Kasahara, K., Ida, S., Shigihara, A. and Honda, T., *Phytochemistry*, 1995, **40**, 1283.
9. Gao, L. and Mazza, G., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**, 118.
10. Ribéreau-Gayon, P., *Composés Phénoliques des Végétaux*, Dunod, Paris, 1968, pp. 143-172.
11. Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M. and Suzuki, M., *Phytochemistry*, 1996, **42**, 199.
12. Terahara, N., Saito, N., Honda, T., Toki, K. and Osajima, Y., *Phytochemistry*, 1990, **29**, 3686.

ANNEXE VI [82]

Palé, E., Kouda-Bonafos, M., Nacro, M., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R. (1999) Les anthocyanes dans quelques plantes africaines *Produits naturels d'origine végétale*, actes du 4^{ème} colloque d'Ottawa, du 26 au 29 mai 1998, CRDI (Canada), pp. 189-194.

LES ANTHOCYANES DANS QUELQUES PLANTES AFRICAINES

Éloi Palé¹, M. Kouda-Bonafos¹, Mouhoussine Nacro¹, M. Vanhaelen² et R. Vanhaelen-Fastré²

¹ Laboratoire de chimie organique appliquée, Faculté des sciences et techniques, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso

² Laboratoire de pharmacognosie et de bromatologie, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la plaine, C.P. 205-4, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgique

Abstract

The anthocyanins are polyphenolic compounds derived from the 2-phenylbenzopyrylium (Flavylium). There are two groups: the 3-oxyanthocyanins and the 3-deoxyanthocyanins. In the plant, the anthocyanin compounds act to protect against different attacks (pathogens, UV rays, etc.). The anthocyanins have many pharmacologic activities: they increase visual faculties and prevent vascular troubles. The anthocyanins are used as food colouring additives and dyes. This study is part of a screening programme for plant pigments, which might be alternatives to synthetic dyes. We isolated thirteen anthocyanins from five plants of Burkina Faso (*Hibiscus sabdariffa*, *Lannea microcarpa*, *Sorghum caudatum*, *Vigna subterranea* and *Ipomoea asarifolia*). Burkina Faso has a high potentiel of anthocyanin plants, a promising source of natural pigments.

I. INTRODUCTION

Les anthocyanes sont des substances naturelles de la famille des flavonoïdes. Elles se distinguent par leur forte polarité due à l'aromaticité du noyau flavylium. D'innombrables recherches ont été effectuées sur ces composés. En 1993, Timberlake annonçait l'existence de plus de 2200 références sur les anthocyanes (1). Aujourd'hui, ce chiffre est sans doute dépassé de très loin. Les anthocyanes sont classées en deux groupes:

- les anthocyanidines (ou anthocyanidols) qui sont issues du noyau flavylium (2-phénylbenzopyrylium) par hydroxylation et/ou méthylation. Ce sont des génines desquelles dérivent le groupe suivant ;

- les anthocyanines (ou anthocyanosides) qui sont issues de la formation de ponts éther entre une(des) molécule(s) de sucre et les génines.

Parmi les anthocyanidines l'on peut distinguer deux sous-groupes (Tableau 1) :

- les 3-oxyanthocyanidines qui possèdent un groupement hydroxyle en position 3; ce sont les plus répandues;

- les 3-désoxyanthocyanidines qui possèdent un hydrogène en position 3. Ces composés sont beaucoup moins répandus dans la nature.

Les anthocyanidines ont un nom systématique, mais il leur est attribué, en général, des noms triviaux en rapport avec le nom de la plante dans laquelle l'anthocyanidine a été isolée pour la première fois. On remarquera que les deux groupes se différencient essentiellement par la position 3. Cette position joue un rôle important dans le comportement chimique des composés anthocyaniques.

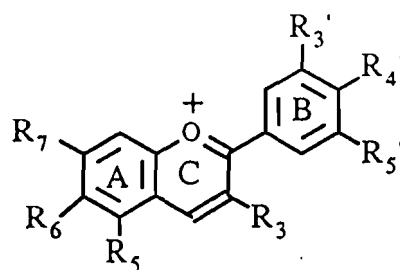


Figure 1. Le cation flavylum substitué; R_3' , R_5' et R_6 sont H, OH ou OCH_3 ; R_3 est glycosyle, OH ou H; et R_4' , R_5 et R_7 sont OH ou un groupe glycosyle.

Tableau 1. Anthocyanidines naturelles connues (2)

Nom	Formule brute	Substitutions (voir Fig. 1)							couleur en solution acide/basique
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
<i>3-oxyanthocyanidines</i>									
aurantinidine	$C_{15}H_{11}O_6$	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	r* p/b
capensinidine	$C_{18}H_{17}O_6$	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OM	r o/b
cyanidine	$C_{15}H_{11}O_6$	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	r/b
delphinidine	$C_{15}H_{11}O_7$	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	r p/b
europinidine	$C_{17}H_{15}O_7$	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	r p/b
hirsutidine	$C_{18}H_{17}O_7$	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OM	r/b
6-hydroxycyanidine	$C_{15}H_{11}O_7$	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	r/b
malvidine	$C_{17}H_{15}O_7$	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	r p/b
5-méthylcyanidine	$C_{16}H_{13}O_6$	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	r o/b
pélagonidine	$C_{15}H_{11}O_5$	OH	OH	H	OH	H	OH	H	j o/b
paeonidine	$C_{16}H_{13}O_6$	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	r o/b
pétunidine	$C_{16}H_{13}O_7$	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	r p/b
pulchellidine	$C_{15}H_{11}O_7$	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	r p/b
rosinidine	$C_{17}H_{15}O_6$	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	r/b
<i>3-désoxyanthocyanidines</i>									
apigénidine	$C_{15}H_{11}O_4$	H	OH	H	OH	H	OH	H	j/r
carajurine	$C_{17}H_{16}O_5$	H	OH	OMe	OH	H	OMe	H	j/r
tricétinidine	$C_{15}H_{11}O_6$	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	r o/r
lutéolinidine	$C_{15}H_{11}O_5$	H	OH	H	OH	OH	OH	H	j o/r

* : r = rouge, o = orangé, j = jaune, b = bleu, p = pourpre.

En effet, le groupe hydroxyl en position 3 est le seul qui ne soit pas phénolique (il est énolique): il est très déterminant aussi bien dans la couleur que dans la stabilité des anthocyanes en solution. Les 3-oxyanthocyanidines et leurs dérivés sont rouges en solution acide et bleus en solution basique, tandis que les 3-désoxyanthocyanidines et leurs dérivés sont jaunes à jaune-orangé en solution acide et rouges en solution basique. Les solutions basiques des anthocyanes sont en général instables: elles se décolorent assez rapidement alors que les solutions acides sont beaucoup plus stables. En outre la stabilité des pigments anthocyaniques est dépendante de leur structure et de la température.

Mais quel pourrait être le rôle des anthocyanes dans la plante? La fonction la plus importante des anthocyanes est leur aptitude à communiquer les couleurs aux plantes ou aux produits dérivés de ces dernières. Les anthocyanes ont un double rôle: elles contribuent à protéger la plante contre différentes attaques (traumatismes, stress, agents pathogènes, radiations ultraviolettes, etc.) et à attirer les animaux qui pourront véhiculer les semences et ainsi assurer la pérennité des espèces. Dans les feuilles, les anthocyanes agissent comme un écran contre les fortes radiations U.V. Barber (3) a montré qu'à haute altitude, où les radiations U.V. sont plus intenses, la production d'anthocyanes par *Eucalyptus urnigera* augmentait fortement. La résistance aux agents pathogènes du pois, du sorgho, du maïs, a également été associée à la présence des anthocyanes.

Enfin, les anthocyanes accroissent la photosynthèse dans les feuilles des plantes des forêts tropicales de même qu'elles régularisent la photosynthèse dans certaines plantes ligneuses.

II. IMPORTANCE SOCIO-ÉCONOMIQUE

Les anthocyanes sont utilisées comme colorants dans l'alimentation, la tannerie, la fabrication des pierres à lécher, etc., et comme médicaments. Elles sont commercialisées par l'industrie pharmaceutique sous le nom de Myrtocyan[®] et également comme additifs alimentaires (colorants) sous le nom de code de la CEE: E163. Leurs propriétés pharmacologiques sont nombreuses. En effet, d'après Bruneton (4), Bénavent (5), Morazzoni et Bombardelli (6), les anthocyanes sont responsables de l'augmentation des facultés visuelles et jouent un rôle important dans la prévention de troubles vasculaires. Elles agissent en favorisant l'équilibre hémodynamique du système circulatoire, en diminuant la perméabilité des capillaires et augmentent ainsi la résistance à la rupture des petits vaisseaux.

Les extraits de sirop d'anthocyanes étaient autrefois administrés pour limiter le saignement qui suit l'ablation des amygdales. Les extraits de fruits de la myrtille étaient utilisés dans le traitement local des stomatites et de certains eczémas. Les extraits de myrtille étaient également consommés par les soldats dans le but d'accroître leur vision nocturne au combat. Les anthocyanes étaient utilisées en diététique; une cure de raisin noir donnait un teint reposé, une peau fraîche et un œil vif. Cette même cure était pratiquée contre la constipation, les hémorroïdes et les dermatoses. Par leurs propriétés antioxydantes, les anthocyanes se comportent comme des pièges de radicaux libres dans l'organisme. Ces activités anti-inflammatoires, anti-ulcériques, antiarthérosclérosiques, et cicatrisantes ont été largement abordées par Morazzoni et Bombardelli (6).

III. DISTRIBUTION

128 espèces de plantes à tannins et à anthocyanes ont été recensées au Burkina Faso par Nacro et Millogo-Rasolodimbi (7). Les pigments anthocyaniques peuvent être rencontrés chez tous les angiospermes à l'exception des caryophyllales. En effet, dans cet ordre, seules les Caryophyllaceae et les Molluginaceae en renferment. Les anthocyanes se retrouvent, en général, dans les pétales des fleurs et dans les fruits. Mais elles sont souvent présentes dans les bractées (Bromeliaceae), dans les feuilles (*Coleus* sp.), dans les pétioles (Rhapoutic), les racines, les gaines des tiges et les graines (*Sorghum caudatum*).

IV. ÉTUDE DES ANTHOCYANES DE QUELQUE PLANTES DU BURKINA FASO

Nous nous sommes intéressés principalement à quatre plantes qui sont largement consommées. Il s'agit de:

- *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) ou oseille de Guinée dont les feuilles sont utilisées pour la préparation des sauces tandis que les calices entrent dans la préparation de boissons locales;

- *Lannea microcarpa* (Anacardiaceae) ou raisinier consommé sous forme de fruit ou de jus fermenté ou non (8);

- *Sorghum caudatum* (Poaceae) ou sorgho rouge ou encore sorgho teinturier beaucoup utilisé dans l'alimentation humaine et animale et dans le tannage et la teinture des cuirs et peaux (9, 10);

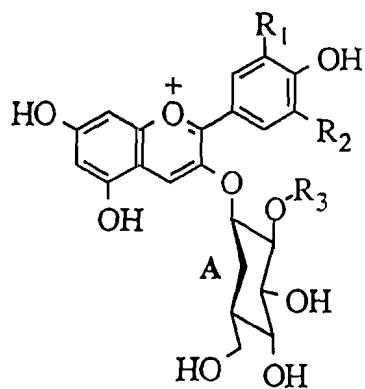
- *Vigna subterranea* (Fabaceae) ou arachide bambara ou encore pois de terre dont les graines sont utilisées exclusivement dans l'alimentation humaine (11).

La méthodologie utilisée est la suivante: les extraits alcooliques (éthanol/acide trifluoroacétique, 99/1 v/v) des pigments des plantes ont été purifiés à l'aide des méthodes chromatographiques usuelles (CCM; CP; CC; CLHP). Les composés majoritaires isolés ont été caractérisés à l'aide des méthodes physico-chimiques (spectrométrie UV-visible, masse, RMN et CLHP). Les structures de 9 composés identifiés sont consignées dans le tableau 2.

Tableau 2. Récapitulatif des pigments anthocyaniques caractérisés dans les quatre plantes étudiées

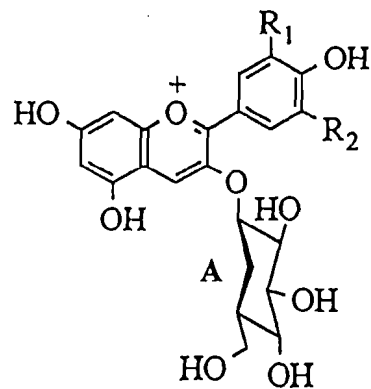
	Teneur (%)		Composés caractérisés	
	%*	%**		
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	<u>1</u> [#]	-	delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside	
	<u>2</u>	70	1,5	delphinidine 3-O-(2-O-β-D-xylopyranosyl)-β-D-glucopyranoside
	<u>4</u>	-		cyanidine 3-O-β-D-glucopyranoside
	<u>5</u>	21		cyanidine 3-O-(2-O-β-D-xylopyranosyl)-β-D-glucopyranoside
<i>Lannea microcarpa</i>	<u>1</u>	-		cyanidine 3-O-β-D-galactopyranoside
	<u>2</u>	92	0,5	cyanidine 3-O-(2-O-β-D-xylopyranosyl)-β-D-galactopyranoside
<i>Vigna subterranea</i>	<u>1</u>	25		delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside
	<u>3</u>	35	0,008	pétunidine 3-O-β-D-glucopyranoside
	<u>5</u>	25		malvidine 3-O-β-D-glucopyranoside
<i>Sorghum caudatum</i>	<u>1</u>	88	0,5	apigénidine
		(95) ^{\$}	(11) ^{\$}	
	<u>2</u>	21		7-O-méthylapigénidine

*: pourcentage relatif des pigments caractérisés; **: en g de pigment pour 100 g de matière sèche; #: Voir figure 2, page suivante; \$ valeur correspondant aux gaines des tiges.



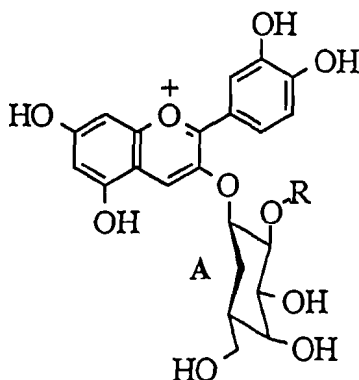
- 1: $R_1 = R_2 = OH$ et $R_3 = H$
 - 2: $R_1 = R_2 = OH$ et $R_3 = \text{xylosyle (sucre B)}$
 - 4: $R_1 = OH$ et $R_2 = R_3 = H$
 - 5: $R_1 = OH, R_2 = H$ et $R_3 = \text{xylosyle}$
- A: glucosyle

Hibiscus sabdariffa (calices des fleurs)



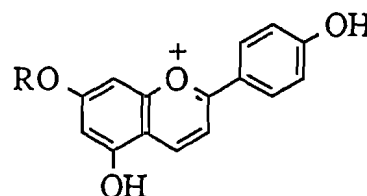
- 1: $R_1 = R_2 = OH$
 - 3: $R_1 = OH$ (ou OCH_3) et $R_2 = OCH_3$ (ou OH)
 - 5: $R_1 = R_2 = OCH_3$
- A: glucosyle

Vigna subterranea (graines, fleurs)



- 1: $R = H$
 - 2: $R = \text{xylosyle (sucre B)}$
- A: galactosyle

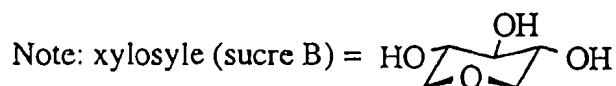
Lanena microcarpa (épicarpe du fruit)



- 1: $R = H$
- 2: $R = CH_3$

Sorghum caudatum (gaines et graines)

Figure 2. Structures complètes des anthocyanosides isolés de quatre plantes étudiées.



À l'examen du tableau 2, il apparaît que les dérivés de la cyanidine et de la delphinidine sont les plus répandus et les plus abondants. Toutefois, même si l'apigénidine est très peu répandue, elle est très abondante dans les gaines des tiges du sorgho rouge (88 %). Toutes ces plantes sont très abondantes en Afrique sub-saharienne et particulièrement au Burkina Faso. De ce fait, elles constituent des sources de colorants pour l'artisanat et l'industrie. À cela, il faut ajouter l'effet bénéfique de la consommation des fruits et graines de ces plantes sur la santé, qui s'explique par les propriétés pharmacologiques des anthocyanes.

V. CONCLUSION

Nos investigations sur les quatre plantes (*Hibiscus sabdariffa*, *Lannea microcarpa*, *Sorghum caudatum*, *Vigna subterranea*) du Burkina Faso ont permis d'identifier 9 pigments anthocyaniques différents dont les dérivés de la cyanidine, de la delphinidine et de l'apigénidine. Nous savons aujourd'hui que les polyphénols en général et les anthocyanes en particulier jouent un rôle très important dans les plantes de même qu'elles peuvent apporter d'énormes bénéfices à la santé humaine.

VI. RÉFÉRENCES

1. Timberlake, Preface in Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains, Ed. CRC Press Tokyo, 362 pages, 1993.
2. G. Mazza et E. Miniati, Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains, Ed. CRC Press Tokyo, 362 pages, (1996).
3. H. N. Barber, Selection in Natural Populations, *Heredity*, 20, 551, (1965).
4. J. Bruneton, Les Anthocyanes in Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. 2ème Ed., Edition Lavoisier, Paris, (1993).
5. M.-R. Bénavent, Propriétés pharmacologiques des anthocyanes. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier I, 110 pages, 1986.
6. P. Morazzoni et E. Bombardelli, *Vaccinium myrtillus* L., *Fitoterapia*, LXVII, 3, (1996).
7. M. Nacro et J. Millogo-Rasolodimbi, Plantes tintoriales et plantes à tanins du Burkina Faso, Scientifika ed, Amiens, 86 pages, 1993.
8. E. Palé, M. Kouda-Bonafos et M., Nacro, Anthocyanins from *Lannea microcarpa*, *Tropical Science*, 38, 1 (1998).
9. A. Serémé, M. Kouda-Bonafos et M. Nacro, Phenolic Compounds in *Sorghum caudatum* Tissues during Plant Development, *Biomass and Bioenergy*, 4, 69 (1993).
10. E. Palé, E. Kouda-Bonafos, M. Nacro, M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastré et R. Ottiger, 7-O-methylapigeninidin, an Anthocyanidin from *Sorghum caudatum*, *Phytochem.*, 45, 1041 (1997).
11. E. Palé, M. Nacro, M. Vanhaelen et R. Vanhaelen-Fastré, Anthocyanins from Bambara Groundnut (*Vigna subterranea*), *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3359 (1997).

RÉSUMÉ

Ce mémoire est une contribution à la recherche de molécules nouvelles d'origine végétale à propriétés colorantes et pharmacologiques. Nous avons isolé et identifié dix anthocyanosides dans quatre plantes récoltées au Burkina Faso.

- Ainsi, le fruit de *Terminalia catappa* renferme la cyanidine 3-O- β -D-glucopyranoside. La teneur du pigment, calculée en cyanidine monoglucoside est de 0,4 g pour 100 g de matière sèche.

- Les fleurs de *Adenium obesum* contiennent la cyanidine 3-O-(4-O- α -L-rhamnosyl)- β -D-galactopyranoside à une teneur de 0,6 g pour 100 g de matière sèche.

- La Cyanidine 3-O- β -D-glucopyranoside, la cyanidine 3-O-(6-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, la pélargonidine 3-O- β -D-glucopyranoside et la pélargonidine 3-O-(6-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside ont été isolées et identifiées dans les fleurs de *Jatropha integrissima*. La teneur en pigment, estimée en cyanidine rhamnosylglucoside (composé majoritaire 2) est de 2,4 g pour 100 g de matière sèche.

- Les pétales des fleurs de *Ipomoea asarifolia* comportent quatre anthocyanosides acylés de structures nouvelles :

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E-p*-caféyl- β -D-glucopyranosyl)]-(6-O-*E*-caféyl- β -D-glucopyranosyl)-5-O- β -D-glucopyranoside ;

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E-p*-coumaryl- β -D-glucopyranosyl)]-(6-O-*E*-caféyl- β -D-glucopyranosyl)-5-O- β -D-glucopyranoside ;

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E-p*-caféyl- β -D-glucopyranosyl)]-{6-O-[4-O-(6-O-*E*-3,5-dihydroxycinnamyl)- β -D-glucopyranosyl]-*E*-caféyl]- β -D-glucopyranosyl}-5-O- β -D-glucopyranoside et

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E*-coumaryl- β -D-glucopyranosyl)]-{6-O-[4-O-(6-O-*E*-coumaryl)- β -D-glucopyranosyl]-*E*-caféyle]- β -D-glucopyranosyl}-5-O- β -D-glucopyranoside. La teneur estimée en anthocyanes totales dans les pétales des fleurs de *Ipomoea asarifolia* est de 2,5 g pour 100 g de matière sèche.

L'étude des activités anti-oxydantes révèle que six des huit composés étudiés sont aussi actifs que l'acide ascorbique pris comme référence. Cette étude indique que l'activité est liée à la nature et au nombre de sucres en position trois de l'aglycone. De même, la nature de l'acyle en position terminale d'un anthocyanoside acylé s'avère très importante dans l'activité anti-oxydante de celui-ci.

Mots clés : colorants, pharmacologique, anthocyanes, anthocyanosides acylés, cyanidine, rhamnosyl, glucosyl, *E-p*-coumaryl, *E*-caféyl, *E*-3,5-dihydroxycinnamyl, activités anti-oxydantes.

RÉSUMÉ

Ce mémoire est une contribution à la recherche de molécules nouvelles d'origine végétale à propriétés colorantes et pharmacologiques. Nous avons isolé et identifié dix anthocyanosides dans quatre plantes récoltées au Burkina Faso.

- Ainsi, le fruit de *Terminalia catappa* renferme la cyanidine 3-O- β -D-glucopyranoside. La teneur du pigment, calculée en cyanidine monoglucoside est de 0,4 g pour 100 g de matière sèche.

- Les fleurs de *Adenium obesum* contiennent la cyanidine 3-O-(4-O- α -L-rhamnosyl)- β -D-galactopyranoside à une teneur de 0,6 g pour 100 g de matière sèche.

- La Cyanidine 3-O- β -D-glucopyranoside, la cyanidine 3-O-(6-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, la pélargonidine 3-O- β -D-glucopyranoside et la pélargonidine 3-O-(6-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside ont été isolées et identifiées dans les fleurs de *Jatropha integrerrima*. La teneur en pigment, estimée en cyanidine rhamnosylglucoside (composé majoritaire 2) est de 2,4 g pour 100 g de matière sèche.

- Les pétales des fleurs de *Ipomoea asarifolia* comportent quatre anthocyanosides acylés de structures nouvelles :

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E-p*-caféyl)- β -D-glucopyranosyl)]-(6-O-*E*-caféyl)- β -D-glucopyranosyl)-5-O- β -D-glucopyranoside ;

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E-p*-coumaryl)- β -D-glucopyranosyl)]-(6-O-*E*-caféyl)- β -D-glucopyranosyl)-5-O- β -D-glucopyranoside ;

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E-p*-caféyl)- β -D-glucopyranosyl)]-{6-O-[4-O-(6-O-*E*-3,5-dihydroxycinnamyl)- β -D-glucopyranosyl)-*E*-caféyl]- β -D-glucopyranosyl}-5-O- β -D-glucopyranoside et

* la cyanidine 3-O-[2-O-(6-O-*E*-coumaryl)- β -D-glucopyranosyl)]-{6-O-[4-O-(6-O-*E*-coumaryl)- β -D-glucopyranosyl)-*E*-caféyle]- β -D-glucopyranosyl}-5-O- β -D-glucopyranoside. La teneur estimée en anthocyanes totales dans les pétales des fleurs de *Ipomoea asarifolia* est de 2,5 g pour 100 g de matière sèche.

L'étude des activités anti-oxydantes révèle que six des huit composés étudiés sont aussi actifs que l'acide ascorbique pris comme référence. Cette étude indique que l'activité est liée à la nature et au nombre de sucres en position trois de l'aglycone. De même, la nature de l'acyle en position terminale d'un anthocyanoside acylé s'avère très importante dans l'activité anti-oxydante de celui-ci.

Mots clés : colorants, pharmacologique, anthocyanes, anthocyanosides acylés, cyanidine, rhamnosyl, glucosyl, *E-p*-coumaryl, *E*-caféyl, *E*-3,5-dihydroxycinnamyl, activités anti-oxydantes.