

Isolation and identification of three mono-glycosylated flavonoids from flowers of *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* M. Gilbert. (Isolement et identification de trois flavonols monoglycosylés des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* M. Gilbert).

Keïta Jean Noël^{1*}, Koné Donatien², Tounkara Hassana², Doucouré Amidou², Garcia Julian³

¹Université de Ségou, Institut Universitaire de Formation Professionnelle (IUFP) BP 24/tél (223)21320230

²Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako(U.S.T.T.B), Faculté des Sciences et Techniques (F.S.T), Département de chimie BP E 3206 /tél (223) 20223244 /fax (223) 20238168

³U.J.F, Service DCM-Bât campus nanobio BP 53-3804/Grenoble Cedex 9 /tél: 0033456520831

*Corresponding Author; Email: jeannoelkeita@gmail.com

Received 14 Oct 2016, Revised 15 Nov 2016, Accepted 20 Nov 2016

Résumé : Le fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice de la phase d'acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* a conduit à l'isolement du kaempférol 3-O- α -L-rhamnopyranoside (afzéline), de la quercétine 3-O- α -L-rhamnopyranoside (quercitrine) et de la 3-O-méthyl quercétine 4'-O- β -D-glucoside (neochilenin). Les structures de ces composés ont été élucidées à l'aide des techniques spectroscopiques modernes (UV, RMN ¹H et ¹³C NOESY ¹H-¹H et HMQC ¹H-¹³C) et la spectrométrie de masse (ESI en mode négatif).

Mots clés : flavonoïdes, afzéline, quercitrine, neochilenin, fleurs, *Vernonia galamensis*.

Abstract: The fractionation by chromatography on a silica gel column of the ethyl acetate layer of the extract of hydromethanol from flowers of *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* led to the isolation of kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside (afzelin), quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside (quercitrin) and 3-O-methyl quercetin-4'-O- β -D-glucoside (neochilenin). The structures of these compounds were elucidated by the use of modern spectroscopic techniques (UV, ¹H and ¹³C NMR, NOESY ¹H-¹H and HMQC ¹H-¹³C) and mass spectrometry (ESI in negative mode).

Keywords: flavonoids, afzelin, quercitrin, neochilenin, flowers, *Vernonia galamensis*

1. Introduction

Les plantes renferment une large variété de molécules chimiques (peptides, terpènes, polyphénols, alcaloïdes...) de propriétés physico-chimiques très différentes et qui présentent une large variété d'activités biologiques

(antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydante...). Il est aujourd'hui reconnu que les plantes constituent une source importante de molécules bioactives. Ce travail consacré à l'étude phytochimique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*, qui par leur richesse en molécules hydrosolubles offrent des opportunités d'investigations orientées sur les flavonoïdes. Selon une récente, révision taxonomique du genre *Vernonia*, l'espèce *Vernonia galamensis* est divisée en six sous-espèces (*nairobensis*, *gibbosa*, *lushotoensis*, *afromontana*, *mutomonensis* et *galamensis*), la sous-espèce *galamensis* est largement distribuée, avec quatre variétés botaniques (*galamensis*, *petitiana*, *australis* et *ethiopica*) séparées géographiquement [1; 2]. Ce travail, dans la suite de l'étude phytochimique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* [3], a pour objet l'isolement et l'identification de flavonoïdes à intérêt thérapeutique dans la phase d'acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*, récoltées à Bamako (dans la cour de la F.S.T) en septembre 2011. Après séchage, les échantillons ont été broyés et réduits à 1Kg de poudre fine.

2.2. Matériels

Lampes UV/254-366 nm ; Rotavapor R-200 BÜCHI ; colonnes ; silice (230-400 mesh) ; plaques CCM analytiques et préparatives (GF 254); banc Kofler ; spectrophotomètre 400 Scan, Varian ; spectromètre Bruker Avance III; spectromètre Bruker à quadripôle.

2.3. Extraction, purification et isolement

La poudre fine des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* (1Kg), est mise à macérer selon le schéma 1.

Une partie de l'extrait d'acétate d'éthyle (4,0g) est soumise au processus de purification basé sur la chromatographie sur colonne de gel de silice. Les fractions RE3, RE4 et RE5 ont été soumises à plusieurs étapes de purification par chromatographie sur colonne de gel de silice et par chromatographie sur plaques préparatives. Ce processus a abouti à l'isolement de 3 composés (F1, F2 et F3) (Schéma 1).

2.4. Elucidation structurale

Composé (F1) : Poudre jaune, Pf : 172-174°C, UV λ_{\max} (MeOH): 263 nm (bande II) et 342 nm (bande I), préfigurant un flavonol 3-OH substitué [4]. La masse molaire de 432 g.mol⁻¹ a été déterminée par le spectre de masse (ESI), avec un ion quasi-moléculaire à m/z 431 [M-H]⁺. L'étude des signaux du spectre RMN-¹H (tableau 1) a permis de mettre en évidence la présence de substituants hydroxyles en C-5 et C-7 sur le cycle A, grâce à l'identification d'un couplage méta des protons H-6 et H-8 du cycle A à δ H 6,20 et 6,38 ppm. La substitution du noyau B est indiquée par la présence deux couples de doublets couplant en position ortho à δ H 7,76 (d, J = 8,4

Hz) et 7,76 (d, $J = 8,4$ Hz) pour H-2' et H-6' et δH 6,94 (d, $J = 8,4$ Hz) et 6,94 (d, $J = 8,4$ Hz) pour H-3' et H-5'. Ce système 2H AA', 2H BB' sur le cycle B permet de placer le groupement hydroxyle en position 4' sur le cycle B. Ces données confirment la présence de la génine kaempférol [5]. Les six autres signaux sont du rhamnose avec son méthyle et son carbone anomérique à δ 17,7 et 103,5 ppm (tableau 1) [5, 6].

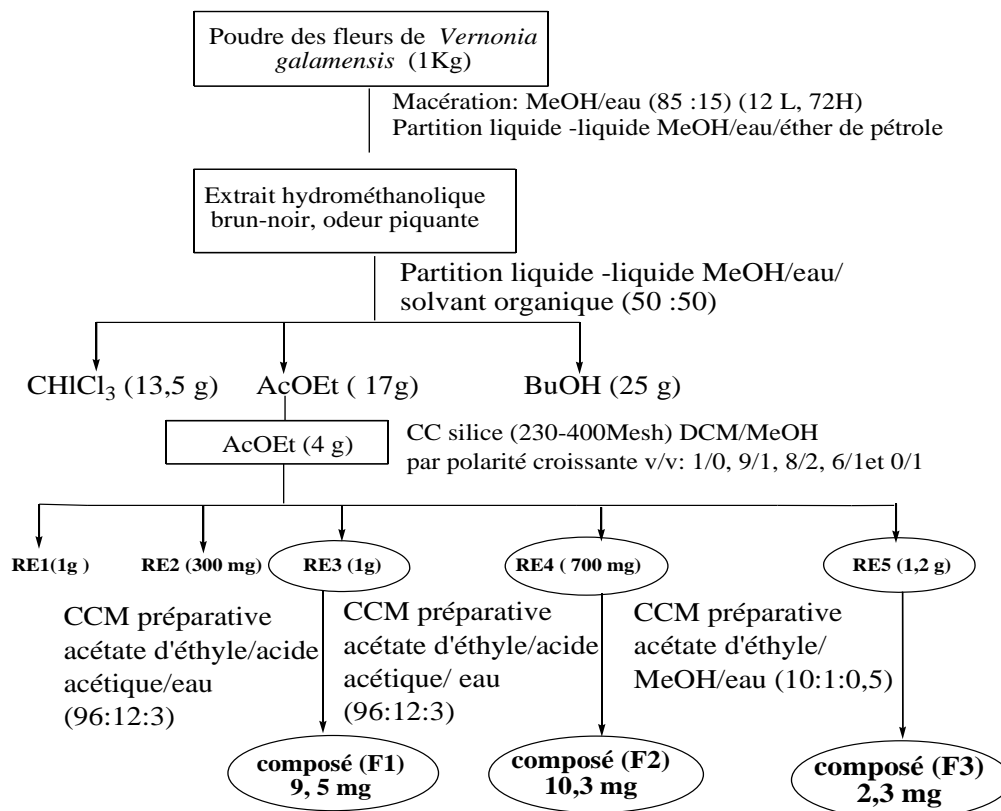


Schéma 1: Schéma d'extraction et d'isolement des composés F1, F2 et F3.

Le déplacement du carbone C-1'' (δC 103,5 ppm) ainsi que celui du proton H-1'' (δH 5,38 ppm) et sa faible constante de couplage ($J = 1,6$ Hz) attestent la configuration α de la liaison anomérique [5, 6]. Le spectre RMN- ^{13}C (tableau 1) indiquent les signaux d'une génine kaempférol et d'un rhamnopyranoside [5, 6]. Le spectre NOESY (1H - 1H) confirme la position 3 du rhamnose sur l'aglycone à travers la corrélation entre les protons H-2'H-6' et le proton anomère H-1'' [5, 6]. Le spectre HMQC (1H - ^{13}C) (tableau 1) nous permet de fixer chaque proton à son carbone. L'ensemble de ces données identifie F1 à la structure au kaempférol 3-O- α -L-rhamnopyranoside (afzéline) (figure 1).

Composé (F2) : Poudre jaune, Pf: 178°C, UV λ_{max} (MeOH) : 254 nm (bande II) et 355 nm (bande I) orientant vers une structure un flavonol 3-OH substitué [4]. La masse molaire de 448 g.mol $^{-1}$ est déduite du spectre de masse (SM-ESI) qui présentait un ion quasi-moléculaire à m/z 447 $[M-H]^-$. Le spectre de RMN- 1H (tableau 1) de F2 montre, entre 6,03 et 7,31 ppm, les signaux de la génine quercétine, ainsi que les signaux d'un rhamnopyranoside [5]: le signal d'un groupement méthyle (H-6'') formant un doublet à δH 0,94 ppm (d, $J = 6,08$ Hz), deux multiplets à δH 3,35 et 3,40 ppm (respectivement H-5'' et H-4'') et deux signaux formant des doublets dédoublés à δH 3,75 ppm (dd, $J = 7,1$ Hz, $J = 3,2$ Hz) pour H-3'' et 4,22 ppm (dd, $J = 3,2$ Hz, $J = 1,8$ Hz) pour H-2''. Enfin le proton

anomérique (H-1'') est observable à δH 5,35 ppm et forme un doublet de constante de couplage $J = 1,8$ Hz attestent de la configuration α de la liaison anomérique [5, 6]. Le spectre de RMN- ^{13}C (tableau 1) de F2 montre vingt et un signaux. L'étude des quinze signaux en dehors de la région des sucres, confirment la présence des signaux caractéristiques d'une génine quercétine : signal situé à δC 179,56 ppm du groupement carbonyle, neuf carbones quaternaires (huit entre 136,17 et 179,56 ppm et un à δC 105,84) et cinq CH aromatiques [5, 6]. Les six signaux restant sur le spectre RMN- 1H appartiennent au sucre, il s'agit d'un hexose (tableau 1) [5, 6]. Le spectre HMQC (1H - ^{13}C) (tableau 1) nous permet de fixer chaque proton à carbone. Ces données identifient F2 à a quercitrine (figure 1).

Tableau 1: Spectres RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de F1 et F2 dans le CD3OD.

Flavonoïdes F1				Flavonoïdes F2			
N°	δC	δH , mult, J (Hz)	HMQC	N°	δC	δH , mult, J(Hz)	HMQC
2	159.3			2	158,44		
3	136.2			3	136,17		
4	179.6			4	179,56		
5	163.4			5	163,09		
6	100.0	6.20 (d, J=2.1)	H-6/C-6	6	99,85	6.03 (d, J=2,1)	H-6/C-6
7	166.0			7	165,84		
8	94.8	6.38 (d, J=2.1)	H-8/C-8	8	94,74	6.37 (d, J=2,1)	H-8/C-8
9	158.5			9	159,24		
10	105.9			10	105,84		
1'	122.6			1'	122,94		
2'	131.9	7.76 (d, J=8.4)	H-2'/C-2'	2'	116,37	7.31 (d, J=2),	H-2'/C-2'
3'	116.6	6.94 (d, J=8.4)	H-3'/C-3'	3'	146,32		H-3'/C-3'
4'	161.7			4'	149,72		
5'	172.0	6.94 (d, J=8.4)	H-5'/C-5'	5'	116,97	6.72 (d, J=8.1)	H-5'/C-5'
6'	131.9	7.76 (d, J=8.4)	H-6'/C-6'	6'	122,94	7.31 (dd, J=8,2; 2)	H-6'/C-6'
Rhamnose				Rhamnose			
1''	103.5	5.38 (d, J=1.6)	H-1''/C-1''	1''	103,44	5.35 (d, J=1,8)	H-1''/C-1''
2''	72.0	4.23 (dd, J=3.3, 1.6)	H-2''/C-2''	2''	71,87	4.22 (dd, J=3,2; 1,8)	H-2''/C-2''
3''	72.3	3.73 (dd, J=8.4, 3.3)	H-3''/C-3''	3''	71,98	3.75 (dd, J=7,1; 3,2)	H-3''/C-3''
4''	73.3	3.40 (m)	H-4''/C-4''	4''	73,24	3.40 (m)	H-4''/C-4''
5''	72.0	3.40 (m)	H-5''/C-5''	5''	72,06	3.40 (m)	H-5''/C-5''
6''	17.7	0.93 (d, J=5.3)	H-6''/C-6''	6''	17,63	0.94 (d, J=6,08)	H-6''/C-6''

Composé (F3) : Poudre jaune, Pf:169- 172°C, UV λ_{max} (MeOH) : 268 nm (bande II) et 346 nm (bande I) caractéristiques d'un flavonol (3-OH substitué) [4]. Le spectre de masse en ESI (mode négatif) indique un ion *quasi*-moléculaire à m/z 476,8 suggérant une masse atomique de 478 g.mol $^{-1}$. L'analyse du spectre de RMN- 1H (tableau 2) de F3 a confirmé la présence des signaux des protons de la génine quercétine ainsi que la présence du signal à $\delta = 3,79$ ppm, (d'intégration 3H) sous forme d'un singulet caractérisant un groupement méthoxyle en position C-3. Le signal à δH 4,94 peut correspondre au proton anomérique du glycoside dont la liaison anomérique

est en position β (constante de couplage entre H-1'' et H-2'' de $J = 7,5$ Hz) (tableau 2) [5]. Les cinq autres signaux présents correspondent aux protons de la partie osidique. Le spectre de RMN- ^{13}C de F3 présente vingt et deux signaux distincts dont quinze correspondants aux signaux d'un flavonoïde. Parmi ceux-ci, il y a dix carbones quaternaires dont un groupement carbonyle C-4 (δC 179,56 ppm) et le carbone 3 caractéristique d'un flavonol (δC 136,17 ppm), et cinq CH aromatiques [5;6]. Le signal à $\delta = 3,79$ ppm (d'intégration 3H) sous forme d'un singulet confirme la présence d'un groupement méthoxyle (tableau 2). Le spectre NOESY (^1H - ^1H) confirme la position du groupe méthoxyle (OCH_3) sur l'aglycone à travers la corrélation entre les protons H-2' H-6' et le singulet du groupe méthoxyle. Le spectre NOESY (^1H - ^1H) confirme la position du glucose sur l'aglycone à travers la corrélation entre le proton H-5' et le proton anomère H-1''. Cette corrélation existe uniquement quand le sucre est en position 4' [5;6]. Le spectre HMQC (^1H - ^{13}C) permet de fixer chaque proton à son atome de carbone (tableau 2). Au vu de tous ce qui précède, F3 a été identifié à la 3-O-méthyl quercétine 4'-O- β -D-glucoside (figure 1).

Tableau 2: Spectres RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de F3 dans le CD_3OD .

Flavonoïde F3			
N°	δC	δH , mult, J (Hz)	HMQC
2	156,9		
3	140,1		
4	179,9		
5	163,0		
6	100,4	6,20 (, d, J=2)	H-6/C-6
7	167,6		
8	95,1	6,39 (d, J=2)	H-8/C-8
9	158,6		
10	105,6		
1'	126,5		
2'	117,1	7,62 (d, J=2)	H-2'/C-2'
3'	148,2		
4'	149,1		
5'	117,6	7,31 (d, J=8,7)	H-5'/C-5'
6'	121,9	7,59 (dd, J=8,5; 2)	H-6'/C-6'
3-OCH ₃	60,7	3,79 (s)	3H/O-CH ₃
D-glucose			
1''	103,4	4,94 (d, J=7,5)	H-1''/C-1''
2''	74,8	3,55 (m)	H-2''/C-2''
3''	77,5	3,52 (m)	H-3''/C-3''
4''	71,3	3,44 (m)	H-4''/C-4''
5''	78,4	3,50 (m)	H-5''/C-5''
6''	62,4	3,74 (m)	H-6''a/C-6''
		3,93 (m)	H-6''b/C-6''

3. Résultats

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des coumarines, des saponines, des stérols et triterpènes, des composés réducteurs, des oses et holosides dans les fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*. L'investigation phytochimique de la phase d'acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique a abouti à l'isolement de l'afzéline (F1) la quercitrine (F2) et la neochilenin (F3).

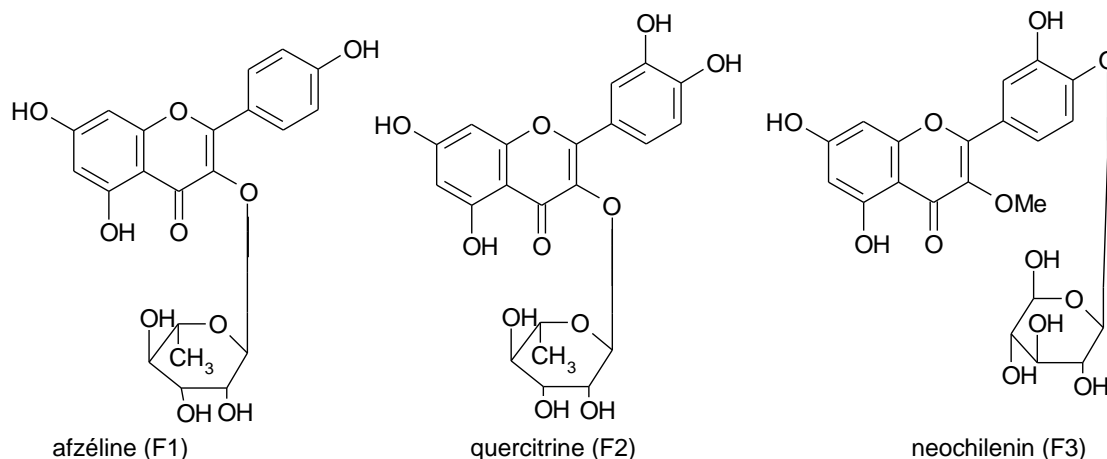


Figure 1 : Structures chimiques des flavonoïdes F1, F2 et F3 isolés des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*.

4. Discussion

L'investigation phytochimique de la phase d'acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique a abouti à l'isolement de l'afzéline (F1), de la quercitrine (F2) et de la neochilenin (F3). Ces résultats illustrent bien que les fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* sont riches en composés phénoliques. Pour la première fois l'isolement de telles molécules bioactives est rapporté dans le genre *Vernonia* [7]. Outre son pouvoir antioxydant [8], l'afzéline (F1) est une molécule anti-complémentaire [9], la quercitrine (F2) manifeste également cette activité anti-complémentaire [9]. L'afzéline (F1) est un anti-inflammatoire [10]. L'afzéline (F1) et la quercitrine (F2) ont des propriétés antipaludiques [11]. L'afzéline (F1) est une molécule antibactérienne [12]. La quercitrine (F2), est une molécule antioxydante [13], hépato-protective [13] connue pour une activité inhibitrice des lipides de peroxydation [14], anti-diarrhéique [15] et anti-inflammatoire [15], anti-leishmanioses [16], antibactérienne [17]. La quercitrine (F2) pourrait être utilisée comme inhibiteurs du MDR [18], elle est également pour ses propriétés insecticides et ovocides [19] et retarde l'apparition de la cataracte [20].

5. Conclusion

Cette étude a permis de renforcer la connaissance de la composition chimique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*. La récente explosion de l'intérêt pour la bioactivité des flavonoïdes est due, aux avantages potentiels pour la santé de ces composants polyphénoliques principaux constituants alimentaires. En perspective, la bioactivité de la neochilenin (F3) sera étudiée. Ces molécules bioactives pourraient être un candidat intéressant pour le développement de médicaments traditionnels améliorés en collaboration le Département de Médecine Traditionnelle du Mali.

Remerciements

Nous remercions Julian GARCIA, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble pour les analyses spectrales.

References

1. MG. Gilbert. Notes on eastern Africa Vernoniaceae (Compositae). IV. A revision of the Vernonia galamensis complex. **Kew Bul.**, **41(1):19-35 (1986).**
2. RE Jr. Perdue, KD. Carlson, MG. Gilbert. Vernonia galamensis potential new crop source of epoxy acid. **Economic Botany.**, **40(1): 54-68 (1986).**
3. A.Doucouré, J.Garcia, D.Koné , AK .Aliou , et JN.Keïta. Isolement de la 3-O-méthylquercétine des fleurs de Vernonia galamensis (Cass.) Less. **J. Soc. Ouest-Afr. Chim.**, **030: 93-102 (2010).**
4. KR. Markham.. Techniques of Flavonoid Identification. **Academic Press: London (1982).**
5. M. Andersen, KR. Markham. Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, **London, New York (2006).**
6. Markham KR , Ternai B. ¹³C NMR of flavonoids-II: Flavonoids other than flavone and flavonols aglycones. **Tetrahedron.**, **32(21):2607-2612 (1976).**
7. NJ. Toyang et R Verpoorte. A review of the medicinal potentials of plants of the genus Vernonia (Asteraceae) . **Journal of Ethnopharmacology** **146.**, **3: 681-723 (2013).**
8. L.Havyarimana, ST.Ndendoung , Tamokou DJde. Atchadé, T. Ade , JM. Tanyi . Chemical constituents of Millettia barteri and their antimicrobial and antioxidant activities. **Pharm Biol.**, **50(2):141-146 (2012).**
9. BS. Min , SY. Lee , JH.Kim , JK. Lee , TJ .Kim , DH.Kim , YH. Kim , H. Joung , HK. Lee , N.Nakamura , H.Miyashiro , M.Hattori .Anti-complement Activity of Constituents from the Stem-Bark of Juglans mandshurica. **Biol. Pharm. Bull.**, **26 (7): 1042-1044 (2003).**
10. HS.Rho, AK.Ghimeray , DS.Yoo ,SM. Ahn , SS.Kwon , KH.Lee , DH.Cho , JY.Cho . Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. **Molecules.**, **16(4):3338-3344 (2011).**
11. Y. Liu, N. Murakami, H. Ji, P. Abreu, and S.Zhang. Antimalarial Flavonol Glycosides from Euphorbia hirta. **Pharmaceutical Biology.**, **45(4): 278-281 (2007).**
12. SY.Lee, YJ. So, MS Shin, JY. Cho, J.Lee.Antibacterial Effects of Afzelin Isolated from Cornus macrophylla on Pseudomonas aeruginosa, A Leading Cause of Illness in Immunocompromised Individuals. **Molecules.**, **19 :3173- 3180 (2014).**
13. CO. Hong , HA.Lee , CH. Rhee , SY.Choung , KW.Lee . Separation of the antioxidant compound quercitrin from Lindera obtusiloba Blume and its antimelanogenic effect on B16F10 melanoma cells. **Biosci Biotechnol Biochem.**, **77(1): 58-64 (2013).**
14. EM. Choi. Protective effect of quercitrin against hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Experimental and Toxicologic Pathology.**, **64(3):211-216 (2012).**
15. D. Camuesco, M.Comalada, MR. Cabezas, A. Nieto, MD. Lorente, A. Concha, A. Zarzuelo, J.Gálve. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. **British Journal of Pharmacology.**, **143(7) : 908-918 (2004).**
- 16.ER. Da-Silva, CCdo. Maquiaveli, PP. Magalhães . The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase. **Exp Parasitol.**, **130 (3):183-188 (2012).**
17. H.Arima, H. Ashida, G.Danno . Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against Bacillus cereus and Salmonella enteritidis. **Biosci Biotechnol Biochem.**, **66 (5):1009-1014 (2002).**
18. W.Choiprasert, N.Dechsupa, S.Kothan, M. Garrigos, S.Mankhetkorn. Quercetin, Quercitrin Except Rutin Potentially Increased Pirarubicin Cytotoxicity by Non-Competitively Inhibiting the P-

Glycoprotein and MRP1 Function in Living K562/adr and GLC4/adr Cells. Am. **J. Pharmacol. Toxicol.**, **5(1): 24-33 (2010)**.

19. BK. Salunke, HM.Kotkar, PS.Mendki, SM.Upasani, VL.Maheshwari. Efficacy of flavonoids in controlling callosobruchus chinensis (L.) (Coleoptera: Bruchidae). **Crop Protection.**, **24(10):888-893 (2005)**.
20. SD. Varma, A. Mizuno, JH. Kinoshita. Diabetic cataracts and flavonoids. **Science.**,**95 (4274): 205-206 (1977)** .

(2016) ;<http://revues.imist.ma/?journal=mjpas&page=index>