*J. Soc. Ouest Afr Chim (2000)* **009**, 89 - 97

# DETERMINATION STRUCTURALE DES COMPOSANTS DES EXTRAITS DE PARKIA BIGLOBOSA

C. KANKO[1], G. T MANH[2], F. KOUADIO[3], A. GUINGANT[2]*, B. LE BIZEC[4], Y. T. N'GUESSAN[1], J. P PRADERE[2], et F ANDRÉ[4].

*(1) Laboratoire de Chimie Organique Structurale, Faculté des Sciences et desT echniques, Université d'Abidjan - Cocody, 22BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.*
*(2) Laboratoire de Synthèse Organique, UMR 6513 au CNRS, Faculté des Sciences et des Techniques, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes cedex3, France*
*(3) Laboratoire des Tissus calcifiés, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place Alexis Ricordeau, BP 84215, 44042 Nantes cedex 1, France.*
*(4) LDH-LNR, École Nationale Vétérinaire, Rte de Gachet, BP 50707, 44307 Nantes cedex 3, France.*

(Reçu le 03 juin 1999 - Révisé le 21 février 2000)

**Abstract** : Structural determination of four sterols isolated from the bark of *Parkia biglobosa* have been identified using GC-MS technique.

**Key words** : *Parkia biglobosa*, mimosaceae, traditional medicine, plant extracts, mass spectra, ergosterol, campesterol, b-sitosterol, stigmasterol

## I - INTRODUCTION

*Parkia biglobosa,* le néré en langue vernaculaire, est un arbre de la famille des Leguminosae (Mimosoideae, Fabaceae) qui pousse dans les zones tropicales africaines, en particulier dans les savanes du nord de la Côte d'Ivoire [1]. Ses racines et son écorce sont utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des trachéites et des bronchites [2]. Par ailleurs, il a été montré que ses graines présentent une activité au niveau de l'hypertension [3]. Traditionnellement, l'écorce de *Parkia biglobosa est* utilisée pour soulager les douleurs dentaires par insertion de la pâte dans la cavité dentaire ou en gardant dans la bouche la décoction pendant quelque temps. Dans ce cadre, une étude récente, réalisée à partir d'extraits hexanique, méthanolique et aqueux d'écor-

ce, a mis en évidence des propriétes analgésiques et anti-inflammatoires au niveau des tests réalisés sur un lot de souris sélectionnées [4]. Nous nous proposons dans ce travail d'effectuer la détermination structurale des composés isolés de l'extrait hexanique par une méthode spectroscopique adaptée.

## II - PARTIE EXPÉRIMENTALE

### II - 1. Méthodes d'extraction

L'écorce de *Parkia biglobosa,* séchée deux semaines à la température ambiante du laboratoire est broyée puis mise à macérer pendant 24 heures dans l'hexane (1500ml d'hexane pour 500g de poudre d'écorce) sous agitation mécanique. La solution hexanique est ensuite filtrée sur buchner et évaporée sous pression réduite. La répétition de ces opérations a permis, à partir de 1.5kg de poudre d'écorce, d'isoler environ 9g d'extrait brut. Ce dernier est repris par de l'hexane (100 ml) et filtré de manière à éliminer le précipité formé. Le filtrat est concentré sous pression réduite pour donner 8g d'un solide dont l'analyse par RMN indique qu'il est constitué presque essentiellement d'acides gras saturés. Toutefois, l'analyse par spectrographie de masse a permis de détecter, à côté des acides gras (vide infra), la présence de stérols. Ces derniers ont pu être isolés sous forme d'un mélange (solide blanc, 100 mg, Fusion : 159-160 °C) après chromatographie sur colonne de silice (Merck, 60-200 mm) en éluant successivement avec de l'hexane puis un mélange hexane-acétate d'éthyle (95/5 et 90/10).

### II - 2. Analyse structurale du mélange des stérols par spectrographie de masse

Le choix de la méthode d'analyse structurale a été dicté par les analyses préliminaires effectuées. La difficulté à solubiliser le mélange de stérols dans les solvants usuels utilisés pour la RMN nous a conduit à procéder à une analyse par chromatographie couplée à un spectrographe de masse haute résolution.

### II - 2. 2 .1. Réactifs

La plupart des réactifs et solvants qui ont servi à cette étude ont été de qualité analytique. Les agents de dérivation suivants, N-méthyl-N-(tert-butyldiméthylsilyl)-trifluoroacétamide (MTBSTFA), N-méthyl-N-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (MSTFA), tert-butyldimethylchlorosilane (TBDMCS) et triméthyliodosilane (TMIS) ont été fournis par Fluka (Buchs, Switzerland). Le dithioerythritol (DTE) a été acheté chez Aldrich (Milwaukke, WI, USA).

### II - 2. 2 2. Matériels

***Couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse***

Les extraits purifiés ont été analysés par GC-MS à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett Packard 5890 (Palo Alto, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse quadripolaire type HP-5989A. La colonne chromatographique utilisée a été de type capillaire HP-1 (30m, 0.25mm de diamètre interne, 0.25 mm d'épaisseur de film). Les paramètres du programme de température ont été 120°C (2 min), 15°C/min jusqu'à 250°C (0 Min) puis 5°C/min jusqu'à 300°C (5min). De l'hélium très haute pureté a été choisi comme gaz vecteur (débit: 1ml/min). Les extraits biologiques ont été injectés dans le mode spitless (purge ouverte à 1 minute). L'enregistrement des signaux spectrométriques a été réalisé dans le mode scan. La ligne de transfert et la source ont été maintenues à 280°C, le quadripôle à 150°C. Les analyses en impact électronique ont été réalisées à une énergie de 70 ev. Les études en ionisation chimique ont été réalisées avec l'ammoniac comme gaz réactionnel.

### II - 2. 2. 3. Procédés

***Réaction de dérivation***

Des analyses préliminaires (MS) ayant montré que l'extrait purifié était composé d'un mélange de stérols (non identifié à ce stade), celui-ci a subi une étape de dérivation avant analyse fine par GC-MS. Deux méthodes de dérivation ont été mises en oeuvre. La première a consisté à dissoudre la substance purifiée dans 100 ml d'un mélange de MSTFA-

TMIS-DTE (1000:5:5, v/v/m), (dérivation TMS) 5. Après agitation au vortex, l'ensemble a été maintenu 60 min à 80°C. La seconde a consisté en l'addition de 100ml d'un mélange de MTBSTFA-TBDMCS (100 : 5, v/v) ; la réaction s'est déroulée 75 min à 80°C, (dérivation TBDMS) 6.

## III - RESULTATS

### III - 1. Dérivation

Les composés appartenant à la famille des stérols possèdent au moins une fonction alcool en position 3, groupement fonctionnel pouvant nuire au signal chromatographique. Les deux réactions de dérivation, en transformant la fonction alcool en fonctions éther de triméthylsilyle ou éther de *tert*-butyldiméthylsilyle ont eu pour conséquence, en réduisant les phénomènes d'adsorption ou de thermolyse, de mieux protéger les stérols d'origine lors de leur séparation chromatographique et de faciliter leur caractérisation. En effet, deux temps de rétention ainsi que deux spectres de masse complémentaires ont permis, pour chacun des constituants du mélange, de déterminer la composition de l'ion moléculaire ainsi que de caractériser certains fragments moléculaires.

### III - 2. Interprétation des signaux GC-MS

***Dérivés TMS et ionisation EI***

Le chromatogramme d'ions obtenu est montré figure 1. Quatre principaux composés ont été détectés. Leur temps de rétention (TR) dans les conditions d'analyse décrites plus haut ont été de 17.80 min, 18.07 min, 18.43 min et 19.18 min; les ions moléculaires des analytes ont été observés respectivement à m/z 468, 472, 484 et 486. Le spectre de masse du composé le plus abondant (β-sitostérol, TR = 19.18 min et M = 486u) est représenté à titre d'exemple, figure 2. Il est caractérisé par un ion (pic de base) à la masse 396, caractéristique de la perte d'un groupement triméthylsilanol.

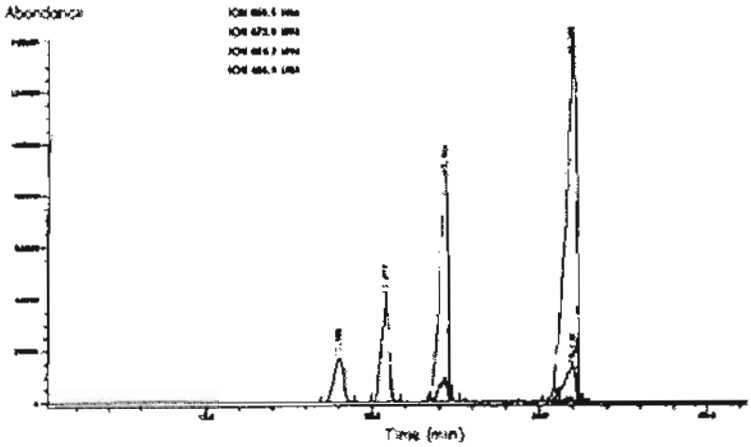



**Figure 1** : *Chromatogramme d'ions (TIC) obtenu en GC-MS (EI) après dérivation* TMS de l'extrait d'écorce.

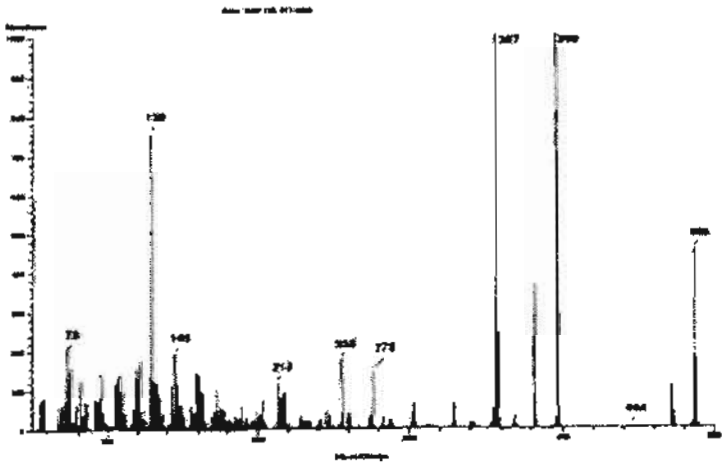


**Figure 2** : *Spectre de masse en impact électronique du β–sitostérol (composé majoritaire du mélange, TR=19.18 min, dérivation TMS).*

***Dérivés TMS et ionisation PCI($NH_3$).***

L'analyse dans le mode ionisation chimique positive avec l'ammoniac comme gaz réactionnel a permis de confirmer pour les quatre analytes leur poids moléculaire grâce à l'observation de l'ion quasi-moléculaire $(M+H)^+$ et du fragment $(M+H\text{-}TMSOH)^+$ formé systématiquement.

***Dérivé TBDMS et ionisation EI***

La seconde méthode de dérivation a permis d'enregistrer un spectre de masse complémentaire. La coupure correspondant à la perte d'un groupement tert-butyle a été naturellement observée en impact électronique; L' ion correspondant constitue le pic de base des spectres de masse des quatre composés préalablement détectés. A titre d'exemple, la figure 3 montre le spectre du composé majoritaire (β-sitostérol). L'ion moléculaire de masse 528 s'est avéré être de faible intensité; en revanche, l'ion résultant de la coupure mentionnée plus haut (m/z 471) est particulièrement abondant.

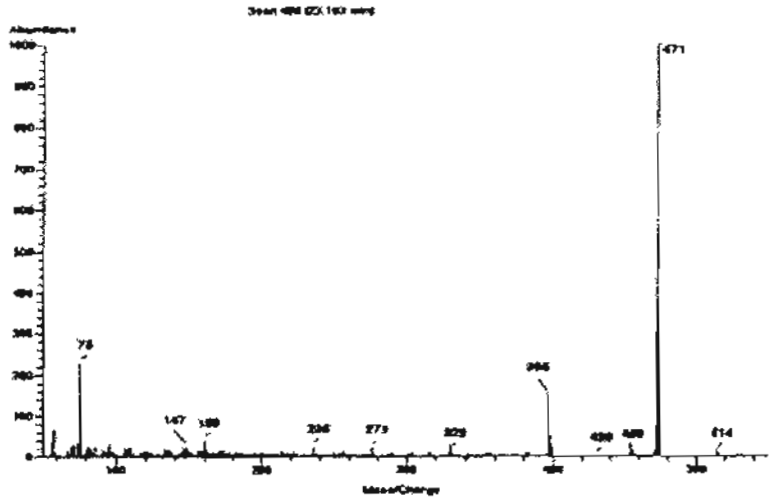
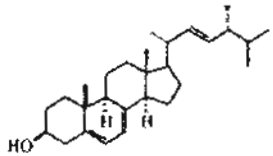



**Figure 3** : *Spectre de masse en impact électronique du β-sitostérol (composé majoritaire du mélange, TR = 23.10 min, dérivation TBDMS).*

Les observations précédentes ainsi que l'étude des fragmentations de chacun des composés du mélange 7 nous ont conduit à attribuer pour ceux-ci les structures suivantes : ergostérol, campestérol, stigmastérol et b-sitostérol (figure 4). Les standards de ces composés étant disponibles commercialement, la vérification de ces attributions structurales a été réalisée en GC-MS selon la méthode analytique décrite précédemment.

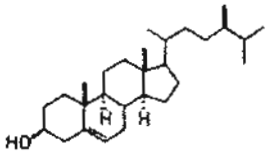
### III - 3. Analyse structurale du mélange d'acides gras par spectrographie de masse

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, l'extrait brut (avant purification par chromatographie) est constitué majoritairement d'acides gras saturés. Une analyse par spectrométrie de masse a permis de les identifier aux acides tétracosanoïque, hexacosanoïque et octacosanoïque.



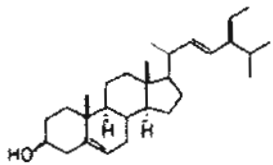

Ergostérol

(22E)-(24R)-24-méthylcholesta-5,7,22-trièn-3β-OL



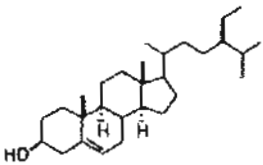

Campestérol

(24R)-24-méthylcholest-5-ène-3




Stigmastérol

(22E)-(24S)-24-éthylcholesta-5,22-diène-3




β-Sitostérol

(24R)-24-éthylcholest-5-ène-3

**Figure 4** : *Structures des quatre stérols identifiés dans l'extrait purifié d'écorce de* Parkia biglobosa.

## IV - CONCLUSION

L'extrait hexanique brut de l'écorce de *Parkia Biglobosa* est constitué majoritairement de trois acides gras (acides tétracosanoïque, hexacosanoïque et octacosanoïque) ainsi que de stérols (ergostérol, campestérol, stigmastérol et β-sitostérol) qui ont pu être isolés par chromatographie et caractérisés par spectrométrie de masse.

## BIBLIOGRAPHIE

[1] - a) AKE ASSI, L. ET ADIANOHOUN, E., *Contribution à l'étude floristique et botanique des plantes médicinales en Côte d'Ivoire* , ACCT, Paris, 1990.

b) HALL, J. B., TOMLINSON, H.F., OGNI. P. I., BUCHY, M. ET AEBISCHER, D. P., *Parkia Biglobosa : a monograph, School of Agricultural and Forest Sciences, Publication N°9,* University of Wales, Bangor (1997).

[2] - KERHARO, J. ET ADAM, J. G., *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle-plantes médicinales et toxiques*, ed.Vigot-Frères, Paris,. pp 579-581, (1950).

[3] - ASSANE, M., BABA MOUSSA, R., BASSANE. E. ET A. SERE, *Dakar-Med.*, 1993, 38(1), 49-54.

[4] - KOUADIO, K., KANKO. C., JUGE. M., GRIMAUD. N., JEAN. A., N'GUESSAN. Y. T. ET PETIT. J. Y. *Phytotherapie Research,* (sous presse).

[5] - LE BIZEC. B., MONTRADE. M-P, MONTEAU. F. ET ANDRÉ. F. *Detection and identification of anabolic steroids in bovine by gas chromatography-mass spectrometry. Anal Chim Acta* 1993, 275 (1-2), 123-133.

[6] - LE BIZEC. B., LE BOULAIRE. S., MONTRADE. M-P, MAUME. D., MONTEAU. F., AUDUSSEAU. G. ET ANDRÉ. F. *Use of new catalysts in silylation reactions for confirmatory analysis of anabolic steroids in biological fluids.* In : HAAGSMA. N. AND RUITER. A. eds. Proceedings of Euroresidue 3, conference of residues of veterinary drugs in food, Veldhoven (May 6-8, 1996), Utrecht : Faculty of Veterinary Medicine, 1996, pp 243-247.

[7] - *Analysis of sterols*, GOAD. L.J. and Akihisa. T., Blakie Academic and Professional, 1997.