

## ACTIVITÉS ANTI-RADICALAIRES DE TROIS ANTHOCYANINES MONOGLUCOSIDES ISOLÉES DES GRAINES DE *GLYCINE MAX*

Adama Hema<sup>1</sup>, Eloi Palé<sup>1,\*</sup>, Pierre Duez<sup>2</sup>, Michel Luhmer<sup>3</sup> and Mouhoussine Nacro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Département de Chimie, UFR-SEA, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso ;

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine CP 205-4, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgique.

<sup>3</sup> Laboratoire de RMN haute résolution, Département de Chimie Université Libre de Bruxelles, CP 160-08, 50 avenue Franklin Roosevelt, B-1050 Bruxelles, Belgique.

(Reçu le 06/01/07 – Accepté après corrections le 11/04/07)

**Résumé :** Des graines du soja noir, *Glycine max*, cultivé au Burkina Faso, trois anthocyanes monoglucosides ont été isolées et caractérisées à l'aide de méthodes chimiques, chromatographiques (CCM, CLHP et CP), spectrométriques (UV-Vis., SM et RMN). Ainsi les graines de *Glycine max* renferment majoritairement la delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside, la cyanidine 3-O-β-D-glucopyranoside et la pétunidine 3-O-β-D-glucopyranoside. La méthode au DPPH nous a permis de déterminer les activités antioxydantes de chacun des trois anthocyanes de *Glycine max*. Les résultats ont été comparés à ceux du thé (thé Lipton) et du vin rouge trouvés dans le commerce local. Il ressort de cette étude la classification suivante selon un ordre croissant du pouvoir antioxydant : Extraits totaux du nin rouge < Extraits totaux de *Glycine max* < cyanidine 3-O-β-D-glucopyranoside < delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside < pétunidine 3-O-β-D-glucopyranoside < Thé Lipton.

**Mots clés :** Soja noir, *glycine max*, anthocyanes, activité anti-radicalaire, antioxydant.

**Summary :** From black soybean, *Glycine max*, grounded in Burkina Faso, three monoglucosylated anthocyanins were isolated and characterized using chemical, chromatographic (TLC, HPLC and PC) and spectrometric (NMR, Mass and UV-visible) methods. Delphinidin 3-O-β-D-glucopyranoside, cyanidin 3-O-β-D-glucopyranoside and petunidin 3-O-β-D-glucopyranoside were found to be the major compounds. The DPPH method allowed determining their antioxidant activities. Which were compared to those of commercial red wine and tea (Lipton tea). The antioxidant capacity of the three anthocyanins of *Glycine max* was found to be intermediate between the red wine total extract and the tea.

**Key words :** Soybean, *glycine max*, anthocyanins, antiradical activity, antioxidant.

### I. INTRODUCTION

Les anthocyanes sont des molécules qui font partie de la famille des flavonoïdes<sup>[1]</sup> et sont capables d'absorber la lumière visible. Ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits<sup>[2]</sup> et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques. Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les

anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines<sup>[3,4,5]</sup>. Leurs propriétés pharmacologiques, notamment antioxydantes, sont nombreuses et bien décrites dans la littérature<sup>[6]</sup>.

La présente étude fait partie de notre programme de recherche sur les composés anthocyaniques d'origine végétale. Elle porte sur une plante du Burkina Faso, le *Glycine max*. Encore appelé soja, *Glycine max*<sup>[7,8,9]</sup> appartient à la famille des

Fabaceae, dans l'ordre des Fabales. C'est une plante herbacée à feuilles composées trifoliées. Le fruit est une gousse déhiscente et les graines sont dépourvues d'albumen. La plante est largement répandue dans les pays chauds. Au Burkina Faso, elle est utilisée dans la fabrication d'un ingrédient de cuisine : le soubala.

Cette étude permet de mesurer pour la première fois les propriétés antioxydantes des anthocyanes des graines du soja noir (*Glycine max*) par la méthode au radical libre 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Des méthodes physiques et chimiques ont d'abord permis d'identifier ces composés et ainsi de disposer de certaines données physico-chimiques. Puis leurs activités anti-radicalaires ont permis une étude comparée avec celles du vin et du thé, boissons connues pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine.

## II. MÉTHODOLOGIE

Les extraits totaux d'anthocyanes sont obtenus par macération du matériel végétal (graines de *Glycine max*) dans un mélange éthanol-acide chlorhydrique (99 : 1, mL).

Après filtration et concentration, la purification des extraits a été effectuée à l'aide des méthodes chromatographiques comme la chromatographie liquide sur colonne (CC), CP et CCM<sup>[10, 11, 12, 13]</sup>. Les composés majoritaires isolés ont été caractérisés à l'aide des spectrométries UV-visible, masse, RMN et de la CLHP<sup>[11, 12, 13, 14, 15]</sup>.

Les extraits totaux du thé (sachets de thé « Lipton yellow Label TEA ») ont été obtenus par macération dans l'eau bouillante (10 sachets (10x2g) / 500 mL). La solution est ensuite filtrée, congelée puis lyophilisée et les extraits secs conservés au dessiccateur sous vide.

Les extraits totaux de vin rouge (J.P Chenet, Cabernet Syrah, vin du pays d'OG, cuvée 2004) ont été obtenus par évaporation de l'alcool sous pression réduite à 30 °C suivi d'une fixation sur amberlite XAD<sub>7</sub>. Après lavage à l'eau, les

anthocyanes ont été éluées par l'éthanol-acide acétique (99 :1, v/v). Après évaporation à presque sec et addition de 20 mL d'eau, la solution est congelée puis lyophilisée et les extraits secs conservés au dessiccateur sous vide.

L'activité antioxydante des composés a été mesurée par la méthode au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) décrite par Blois et al.<sup>[16]</sup> et Chang et al.<sup>[17]</sup>. Six solutions d'échantillon (de 500 µL) de concentrations différentes sont préparées et 3 mL de solution de DPPH (9,85 mg/250 mL MeOH) y sont additionnés. L'absorbance est lue au bout de 10 min au spectrophotomètre à 517 nm avec le méthanol comme blanc. La droite de régression « absorbance en fonction de la concentration » est ensuite tracée et la détermination de la concentration correspondant à une variation d'absorbance de 50% par rapport à l'ordonnée à l'origine donne l'IC<sub>50</sub>. Cette valeur est ensuite comparée à celle des extraits totaux du vin rouge et du thé.

## III. RÉSULTATS

### 3.1. Identification

La CLHP de l'extrait brut de *Glycine max* a donné 4 pics [**a** ; t<sub>R</sub> = 9,62(0,34%), **b** ; t<sub>R</sub> = 12,36(0,74%), **c** ; t<sub>R</sub> = 16,14(0,16%), **d** ; t<sub>R</sub> = 17,73(0,01%)]. (Figure 1)

Après fractionnement par chromatographie sur papier de l'extrait brut, avec comme solvant d'éluion le système BAW, 3 des 4 composés ont été isolés et purifiés : **1**, **2** et **3**.

L'analyse du chromatogramme CLHP des composés obtenus a montré que les pics **a**, **b** et **c** correspondent respectivement aux composés **1**, **2** et **3** (Figure 2).

Les spectres UV-vis de ces composés, dans le MeOH-HCl 0,01 N font apparaître deux bandes caractéristiques des composés anthocyaniques. L'une dans l'UV vers 280 nm et l'autre dans le visible entre 528 et 540 nm.

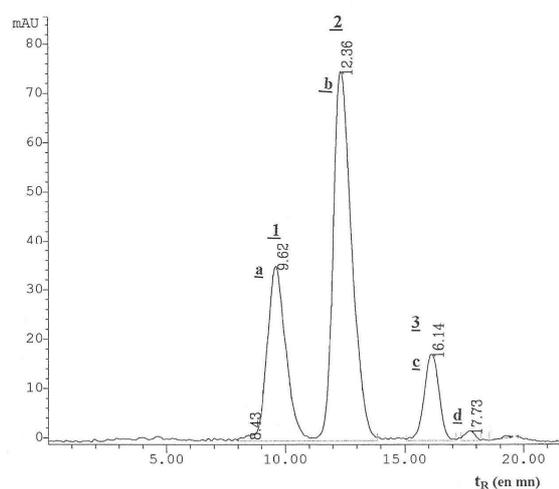
En effet, la bande d'absorption caractéristique des composés **1** et **3** vers 540 nm suggère que ceux-ci sont des dérivés de la delphinidine, pétunidine ou malvidine. Le composé **2** qui absorbe vers 529 nm serait un dérivé de la cyanidine ou de la péonidine.

L'addition de 2 à 3 gouttes de AlCl<sub>3</sub> 5% dans les solutions méthanoliques de ces composés provoque un déplacement bathochrome du maximum d'absorption dans le visible, ce qui révèle la présence de groupements orthodiphénols libres sur le noyau B. Ces résultats permettent de dire que le composé **1** est un dérivé de la delphinidine ou de la pétunidine, alors que les composés **2** et **3** seraient respectivement des dérivés de la cyanidine et de la pétunidine. Ceci se justifie par le fait que la péonidine et la malvidine ne possédant pas de groupements orthodiphénols libres ne donnent pas de déplacement bathochrome avec l'AlCl<sub>3</sub>.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la CLHP, puisque les temps de rétention des dérivés de la cyanidine et de la pétunidine **2** et **3** sont supérieurs à celui du dérivé de la delphinidine **1**; ceci est aussi en accord avec les données de la littérature. Les E<sub>440</sub>/E<sub>maxvis</sub> suggèrent que la position 5 des composés **1**, **2** et **3** est libre.

La CCM des produits de l'hydrolyse totale de l'extrait brut, dans le forestal comme solvant d'élution, en même temps que des standards a donné trois taches, correspondant à la delphinidine, la cyanidine et la pétunidine. L'hydrolyse contrôlée des composés **2** et **3** n'a donné aucune tache intermédiaire entre l'aglycone et les anthocyanines. Ces composés sont donc monoglycosylés. L'analyse en CCM sur cellulose des aglycones de ces deux composés, avec le forestal comme solvant d'élution, a montré qu'ils correspondent à la cyanidine et à la pétunidine utilisées comme standard. Le sucre serait situé en position 3, car d'après Ribéreau-Gayon, les 3-oxyanthocyanines sont plus stables [12, 13].

L'analyse par CCM sur cellulose de l'aglycone du composé **1**, en utilisant le forestal et le BAW comme solvants d'élution, a montré qu'il correspond à la delphinidine utilisée comme standard. L'hydrolyse contrôlée de **1** n'a donné aucun intermédiaire. Le composé **1** serait donc un dérivé 3-monoglycosylé de la delphinidine.



**Figure 1** : Chromatogramme CLHP d'un extrait méthanolique des graines de *Glycine max*

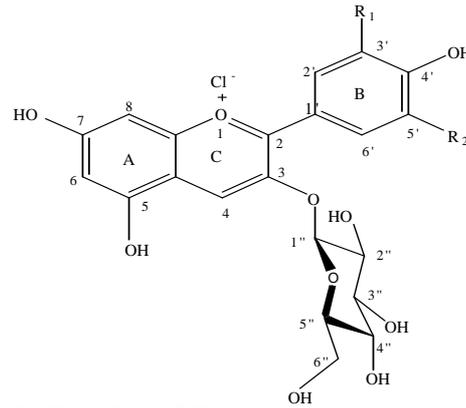
Les spectres de masse des composés **1**, **2** et **3** donnent respectivement des ions moléculaires m/z 465, 449 et 479 en accord avec les masses calculées à l'aide des formules brutes C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>12</sub>, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub> et C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub>. (Tableau I)

Le composé **2** dérive de **1** par la perte d'un OH tandis que **3** dérive de **1** par gain d'un méthylène (CH<sub>2</sub>). De plus l'analyse des ions secondaires à m/z 303 pour **1**, m/z 287 pour **2** et à m/z 317 pour **3** sont attribués à la perte [M-162]<sup>+</sup> d'un résidu glycosylé. La position 3 du glycosyle sur l'aglycone a été déduite à l'aide du déplacement chimique des protons anomériques et des valeurs des rapports E<sub>440</sub>/E<sub>maxvis</sub> [18, 19]. Les signaux des protons des 3 composés **1**, **2** et **3** sont attribués principalement à l'aide du spectre de corrélation homonucléaire du proton (COSY) et la position des sucres est confirmée par les effets overhauser (DIFFNOE). La valeur élevée des constantes de couplage (**J≈7,8 Hz**)

observées pour les signaux des protons anomériques des glycosyles des trois composés suggère que ceux-ci soient sous la forme β-D-glycopyranose.

Aussi, sur les spectres RMN-<sup>1</sup>H (Tableau II), les régions relatives aux aglycones sont en parfait accord avec les résultats publiés pour d'autres dérivés 3-monoglycosylés de la delphinidine, cyanidine et de la pétunidine.

Ainsi, les composés **1**, **2** et **3** ont été identifiés comme étant respectivement : la delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside, cyanidine 3-O-β-D-glucopyranoside et la pétunidine 3-O-β-D-glucopyranoside.



**1** : R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH

**2** : R<sub>1</sub> = OH et R<sub>2</sub> = H

**3** : R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> et R<sub>2</sub> = OH

**Figure 2:** Structure complète de **1**, **2** et **3** isolés des graines de *Glycine max*

**Tableau I:** Données spectrales et chromatographiques des anthocyanosides des graines de *Glycine max*

Composé s	R <sub>f</sub> en CCM (x100)				Données spectrales			
	Aglycones		Anthocyanosides		CLHP	Spectrométrie électronique		TOF ES <sup>+</sup>
	Forestal*	BAW*	BAW*	EFAW**	t <sub>R</sub> (en min)	λ <sub>max</sub> (en nm)	E <sub>440</sub> /E <sub>maxvis</sub> (%) AlCl <sub>3</sub> (+)	m/z
<b>1</b>	37	19	32	21	9,62	540	18 (+)	[M] <sup>+</sup> 465 [M-162] <sup>+</sup> 303
<b>2</b>	65	28	52	31	12,36	529	26 (+)	[M] <sup>+</sup> 449 [M-162] <sup>+</sup> 287
<b>3</b>	62	22	46	27	17,73	536	17 (+)	[M] <sup>+</sup> 479 [M-162] <sup>+</sup> 317

Adsorbant : \*cellulose microcristalline F<sub>254</sub> (0,1 mm Merck) et \*\* silice 60 F<sub>254</sub> (0,1 mm)  
Addition de deux à trois gouttes d'AlCl<sub>3</sub> : + = effet bathochrome

**Tableau II:** Données RMN-<sup>1</sup>H des anthocyanosides des graines de *Glycine max*

Aglycones	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
	δ(ppm) J(Hz)* Delphinidine	δ(ppm) J(Hz)* cyanidine	δ(ppm) J(Hz)* pétunidine
H4	8,91 ; s	8,95 ; s	8,98 ; s
H6	6,76 ; d(1,09)	6,76 ; s	6,98 ; d(1,2)
H8	6,90 ; d(1,09)	6,93 ; s	7,11 ; d(1,2)
H2'	7,8 ; s	8,08 ; d(2,3)	7,97 ; d(2,4)
H5'		7,08 ; d(8,7)	
H6'	7,8 ; s	8,26 ; dd(2,3 ; 8,7)	7,88 ; d(2,4)
H1''	5,41 ; d(7,68)	5,38 ; d(7,7)	5,53 ; d(7,8)
H2''	3,59 ; dd(7,68 ; 9,05)	3,55 ; t(7,7 ; 9,1)	3,58 ; dd (7,8 ; 9,0)
H3''	3,33 ; t(9,05)	3,33 ; t(9,1)	3,35 ; t(9,0)
H4''	3,47 ; t(9,05)	3,46 ; t(8,8)	3,48 ; t(9,0)
H5''	3,6 ; m	3,6 ; m	3,6 ; m
H6 <sub>a</sub> ''	3,81 ; dd(9,88 ; 3,0)	3,8 ; d (9,87)	3,8 ; m
H6 <sub>b</sub> ''	3,6 ; dd (9,88 ; 6,32)	3,6 ; m	3,6 ; m
OCH <sub>3</sub>			3,97 ; s

Multiplicité : s = singulet, d = doublet, dd = double doublet, t = triplet, m = multiplet

\*: Ces attributions ont été faites d'après les constantes de couplage et les données de la littérature [11, 12, 13, 14, 19].

### 3.2. Activités anti-radicalaires mesurées

Les activités anti-radicalaires des anthocyanes isolées et caractérisées de *Glycine max* ont été déterminées et les résultats sont consignés dans le tableau III. Il ressort de ces résultats que les extraits totaux d'anthocyanes du vin rouge et de *Glycine max* ont des activités comparables. Toutefois, ceux-ci sont moins actifs que chacun des composés purs isolés de *Glycine max*. Des trois composés purs isolés et caractérisés (**1**, **2**, et **3**), le composé **2** (dérivé de la cyanidine) est le moins actif alors que **3** (dérivé de la pétunidine) est le plus actif. Cette activité anti-radicalaire des extraits totaux de *Glycine max* comparable à celle du vin rouge serait donc aussi liée à la présence des anthocyanes ; celle du thé étant, bien sûr, liée à la présence d'autres polyphénols.

**Tableau III** : Résultats des mesures des activités antioxydantes des composés

Composés	IC <sub>50</sub> (en µg/mL)
Extraits totaux de <i>Glycine max</i>	14,43
<b>1</b> : delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside	13,25
<b>2</b> : cyanidine 3-O-β-D-glucopyranoside	14,34
<b>3</b> : pétunidine 3-O-β-D-glucopyranoside	13,02
Thé Lipton	5,92
Extraits totaux du Vin rouge	14,87

### IV. CONCLUSION

La delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside, la cyanidine 3-O-β-D-glucopyranoside et la pétunidine 3-O-β-D-glucopyranoside sont les trois anthocyanes que nous avons isolés des graines d'une plante du Burkina Faso : *Glycine max* (Figure 2). La mesure des activités anti-radicalaires a été effectuée sur ces composés majoritaires, sur les extraits totaux de *Glycine max*, du vin rouge et du thé Lipton. Ce dernier présente une activité anti-radicalaire voisine à celle de l'acide ascorbique pris comme référence. Il en résulte que chacun

des trois composés majoritaires de *Glycine max* est plus actif que l'extrait brut.

### Remerciements

Les auteurs remercient l'Université Libre de Bruxelles et l'Université de Ouagadougou pour leur participation financière.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1]- Ribéreau-Gayon P., Composes Phénoliques des Végétaux. Chapitre VI : Les Anthocyanes / Dunod Edition 1968, Paris.
- [2]-Palé, E., Nacro, M., Vanhaelen, M., and Vanhaelen-Fastré, R. Anthocyanins from fruits of *Vigna Subterranea*. *J. Agric. Food Chem.*, (1997) **45**, 3359-3361.
- [3]-Palé, E., Kouda-Bonafos, M., Nacro, M., Vanhaelen, R., Vanhaelen Fastré, R., and Ottinger, R.. 7-O-methyl apigeninidin, an anthocyanin from *Sorghum caudatum*. *Phytochemistry*, (1997) **45**, 1091-92.
- [4]-Séréme, A., Kouda-Bonafos, M., and Nacro, M. Phenolic compounds in *Sorghum caudatum* tissues during plant development. *Biomass and Bioenergy*, (1993) **4**, 69-71.
- [5]-Kouda-Bonafos M., Czyzewska, E., Nacro, M., and Oehlschlager, A.C. Isolation of apigeninidin from leaf sheaths of *Sorghum caudatum*. *Journal of Chemical Ecology*, (1994) **20**, 2123-2125.
- [6]- Morazzoni P., Magistretti M.J., *Fitoterapia* (1990) 61, 13-21.
- [7]-Kerharo, J. G. La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle. Plantes Médicinales Et Toxiques / Vigot Frère Edition 1974, Paris.
- [8]-Morvan, R. G. Encyclopédie Internationale des Sciences et Techniques. tome 8 /. Presse de la cité Edition 1972, France.
- [9]-Aké Assi, L., Guinko, S. Plantes Utilisées Dans La Médecine Traditionnelle En Afrique De l'Ouest / Roche Edition 1991, Basel Switzerland.
- [10]- Du T.C., Francis J.F., *J. Sci.* (1973) 38, 810-815
- [11]- Palé E., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R., Ottinger R. *Phytochemistry* (1998) 48, 1433-1437.
- [12]- Palé E., Kouda-Bonafos M., Nacro M., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R., *Phytochemistry* (2003) 64, 1395-1399.
- [13]- Wagner H., Blatt S., Plant drug analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Part 12

: Drugs containing pigments / Springer  
Edition, Paris.

**[14]**- Terahara N., Saito N., Honda T., Osajima  
T., *Tetrahedron Lett.* (1990) 31, 2921-2924.

**[15]**- Terahara N., Oda M., Mitsui T., Osajima  
Y., Saito N., Toki K., Honda T., *J. Nat. Prod.*  
(1996) 59, 139-144.

**[16]** -Blois, M. S. Antioxidant determinations  
by the use of a stable free radical. *Nature*  
(1958) 181, 1199-1200.

**[17]** - Chang W.-S., Lee Y.-J., Chiang H.-C.,  
*Anticancer Research* (1993) 13, 2165-2169.

**[18]**- Odake K., Terahara N., Saito N., Toki K.,  
Honda T., *Phytochemistry* (1992) 31, 2127-  
2133.

**[19]**- Saito N., F.Tatsuzawa, Honko A., win  
W.K., Yokoi M., Shigihara Honda A., T.,  
*Phytochemistry* (1996) 41, 1613-1620.